

Vergleichende Untersuchungen
über Vibrionen
und vibrionenähnliche Mikroorganismen

Margot Weiger

Aus dem Tierhygienischen Institut der Universität München

Vorstand: Professor Dr. A. M e y n

Vergleichende Untersuchungen

über Vibrionen

und vibrionenähnliche Mikroorganismen



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Margot W e i g e r
aus
W i n h ö r i n g

München 1958

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. K. Z i p f

Referent: Professor Dr. M. R o l l e

Tag der Promotion: 25. Juli 1958

Meinen Eltern in Dankbarkeit



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung

B. Schrifttum

I. Verbreitung und Bedeutung

1. *Vibrio foetus*

a) katalasepositive und H_2S -negative Stämme

b) katalasenegative und H_2S -positive Stämme

2. *Vibrio jejuni*

3. *Spirillum suis*

4. Vibrionenähnliche Keime

II. Züchtung

1. *Vibrio foetus*

a) feste Nährböden

b) flüssige und halbfeste Nährböden

c) wachstumssteigernde Nährbodenzusätze

2. *Vibrio jejuni*

3. *Spirillum suis*

4. Vibrionenähnliche Keime

III. Isolierung

IV. Biochemische Eigenschaften und Differenzierung

1. *Vibrio foetus*

a) gemeinsame Eigenschaften der katalasepositiven
und katalasenegativen Stämme

b) unterschiedliche Eigenschaften der katalasepositiven
und katalasenegativen Stämme

2. *Vibrio jejuni*

3. *Spirillum suis*

4. Vibrionenähnliche Keime

C. Material und Methodik

I. Material

II. Methodik

D. Eigene Untersuchungen

I. Biochemische und kulturelle Eigenschaften

1. Prüfung der Katalase- und Schwefelwasserstoffbildung

a) Katalase

b) Schwefelwasserstoff

2. Prüfung des Wachstums bei verschiedenen Temperaturen

3. Prüfung des Wachstums bei verschiedenen pH-Werten

4. Prüfung des Wachstums in Peptonwasser

5. Wachstum in Pferde- und Rinderleberbouillon und in Hirnbrei

6. Wachstum in Gelatine

7. Wachstum in Agar

8. Wachstum in Peptonwasser mit Harnstoffzusatz

9. Nitratreduktion

10. Indolbildung

11. Nitroso-Indol-Reaktion

12. Voges-Proskauer- Probe

13. Verhalten gegenüber Kohlenhydraten

II. Untersuchung über die selektiv-wachstumshemmende Wirkung verschiedener Antibiotika und Hemmstoffe

1. Antibiotika

a) bakterizide Wirkung

b) bakteriostatische Wirkung

Plattentest

Röhrchentest

2. Hemmstoffe

E. B e s p r e c h u n g

I. Gemeinsame kulturelle und biochemische Eigenschaften
(Tabelle XVIII)

II. Differenzierung auf Grund unterschiedlicher kultureller
und biochemischer Eigenschaften (Tabelle XVIII)

1. Gruppe: V. foetus-Stämme

a) Gemeinsame Eigenschaften der katalasepositiven
und katalasenegativen Vibrio-foetus-Stämme

b) Unterschiedliche Eigenschaften der katalaseposi-
tiven und katalasenegativen Vibrionenstämme

2. Gruppe: 59, 60, 72

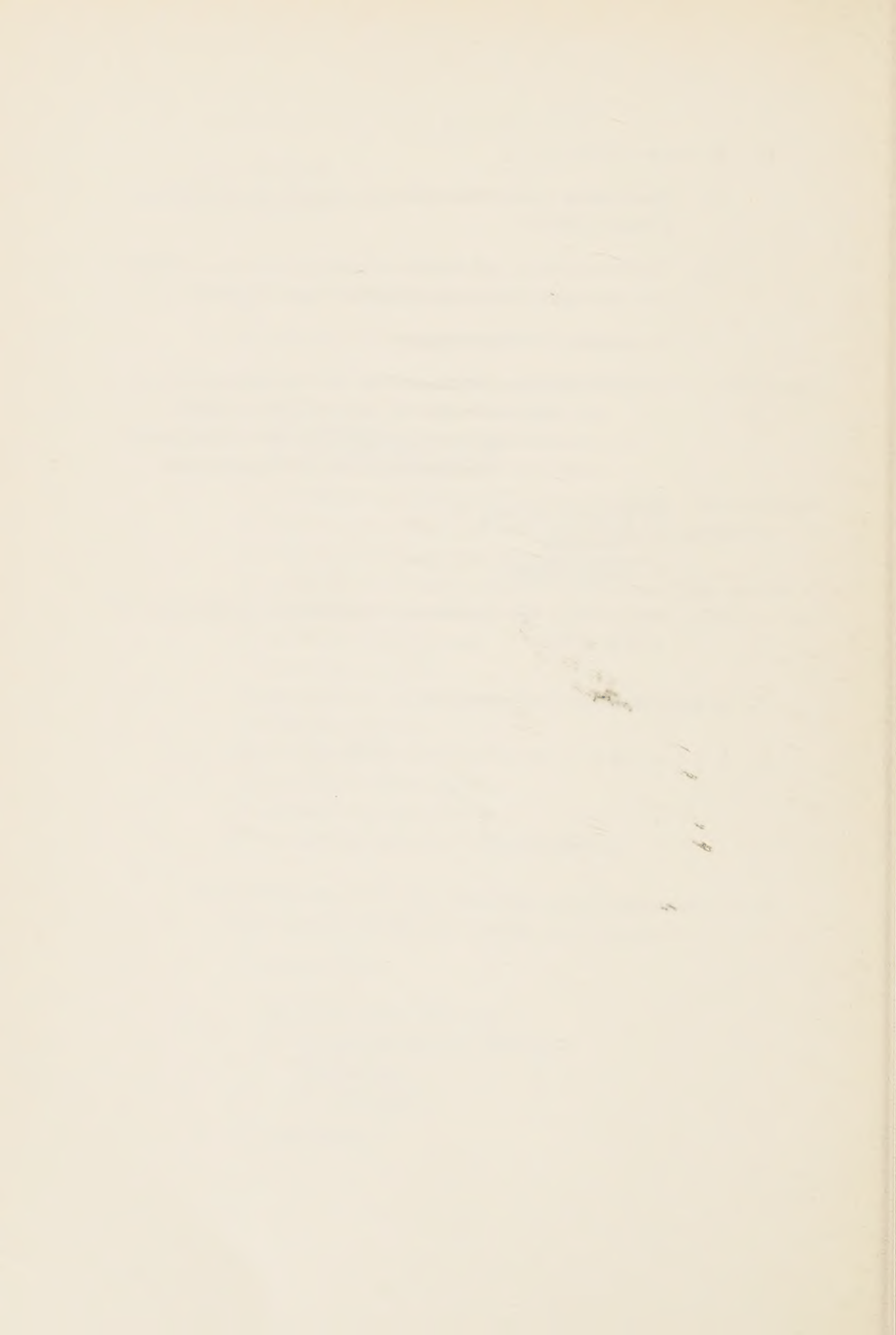
3. Kotstämme

4. Jauchestämme

III. Möglichkeit der Isolierung aus verunreinigtem Material
(Tabelle XIX)

F. Z u s a m m e n f a s s u n g

G. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s



A. Einleitung

Durch die Intensivierung der Tierzucht und besonders durch die Einführung der künstlichen Besamung in der Rinderzucht haben die Deckinfektionen eine besondere Bedeutung erlangt. *Vibrio foetus*, von Mc Fadyean und Stockman (12) 1909 zuerst nachgewiesen, ist eine Ursache der enzootischen Sterilität und des ansteckenden Verwerfens bei Rindern und auch bei Schafen. Neben diesen pathogenen Vibrionen kommen in den Geschlechtsorganen der Rinder aber auch apathogene Vibrionen vor. Vibrionen und vibrionenähnliche Keime treten auch als Enteritiserreger bei Rindern und Schweinen auf und sind häufig in großer Anzahl in Stalljauche und auch im Wasser und in der Erde zu finden. Alle diese Keime sind morphologisch sehr ähnlich und deshalb mikroskopisch nicht oder nur sehr schwer voneinander zu unterscheiden. In der Literatur finden sich nur wenige vergleichende Untersuchungen zwischen pathogenen und apathogenen Arten.

Für die Diagnose ist es entscheidend, ob die im Untersuchungsmaterial nachgewiesenen Vibrionen eine ätiologische Bedeutung haben oder ob sie nur eine zufällige Verunreinigung darstellen.

Da den pathogenen Vibrionen bestimmte Eigenschaften zukommen, habe ich von Herrn Professor Dr. Roile die Aufgabe bekommen, verschiedene Vibrionen und vibrionenähnliche Mikroorganismen, die bei Haustieren und in deren Umgebung vorkommen, kulturell und biochemisch zu vergleichen.

B. S c h r i f t t u m

I. Verbreitung und Bedeutung

Vibrionen und vibrionenähnliche Keime sind in der Natur sehr verbreitet. Die meisten von ihnen leben im Wasser und sind apathogen, nur einige Arten verursachen Krankheiten. Beim Menschen wird die Cholera durch das *V i b r i o c o m m a* hervorgerufen. Auch bei verschiedenen anderen Erkrankungen, so bei Aborten (*V i n c e n t*, (64)), konnten in einzelnen Fällen Vibrionen nachgewiesen werden.

Bei Haustieren wurden Vibrionen als Krankheitserreger nachgewiesen. So sind bei Rindern und Schafen Vibrionen eine Ursache von Fortpflanzungsstörungen. Bei Rindern und Schweinen treten Vibrionen als Enteritiserreger auf. *B e r g e y* (4) gibt 22 verschiedene Arten von Vibrionen an, die durch biochemische Verfahren voneinander getrennt werden können, weitere 80 werden erwähnt. Inzwischen sind neue Arten beschrieben worden.

1. *V i b r i o f o e t u s*

a) katalasepositive und H_2S negative Stämme.

V. f o e t u s wurde von *M c F a d y e a n* und *S t o c k m a n* 1909 (12) zum ersten Mal in abortierten Schaf- und Rinderfoeten nachgewiesen und herausgezüchtet.

1918 berichtet auch *S m i t h* (58) über Vibrionen, die er aus abortierten Rinderfoeten isolieren konnte. Zusammen mit *T a y l o r* (59) beschreibt er in der Folgezeit diese Keime eingehend und benennt sie 1919 *V. f o e t u s*. *Vibrio* und nicht *Spirillum*, wie *M c F a d y e a n* und andere Forscher deshalb, weil diese Bakterien nur eine polare Geißel besitzen - die auch fehlen kann - und in ihren aktivsten Vermehrungsstadien kommaförmig sind.

B e r g e y (4) definiert Vibrionen als kurze gekrümmte Zellen, die einzeln oder in Spiralen vorkommen. Sie sind gram-negativ. Die Bewegung erfolgt durch eine polare Geißel, die gewöhnlich ziemlich kurz ist, selten tritt ein Büschel von zwei oder drei Geißeln auf.

Diese Vibrionen wurden in fast allen Kulturländern der Welt im Zusammenhang mit Fortpflanzungsstörungen bei Rindern und auch bei Schafen beobachtet.

Die klinischen Symptome einer *V. foetus* - Infektion bei Rindern bestehen nach Götz (21), in Übereinstimmung mit zahlreichen anderen Forschern, in:

- a) herdenmäßigem, teils regelmäßigem, teils aussetzendem Umrindern (embryonale Aborte)
- b) Scheidenkatarrhen,
- c) gelegentlichen Aborten, besonders im 4. - 6. Monat, bei Frischinfektionen bei Kühen und Färsen, später durch auftretende Immunität hauptsächlich bei Färsen.

Auf die Bedeutung der enzootischen Sterilität wiesen als erste Stegenga und Terpsstra (56) in Holland hin. Jetzt mißt man allgemein der durch die Vibrionen verursachten Sterilität eine größere Bedeutung zu, als den durch sie hervorgerufenen Aborten. Beim Bullen, der der Überträger der Seuche ist, treten nur ausnahmsweise durch Vibrionen verursachte Veränderungen am Sperma oder an den Geschlechtsorganen auf (34, 67, 57, 21). Die Veränderungen an den abortierten Foeten sind nicht charakteristisch für Vibrionenaborte.

b) Katalasenegative und H_2S positive Stämme.

In den Geschlechtsorganen der Rinder kommen neben pathogenen Vibrionen auch apathogene vor, die morphologisch nicht voneinander zu unterscheiden sind. (Florent (13), Bryner und Frank (7) (8), Dediér und Voigt (10), Hubrig (25) (27) (29), Pröger (47), Goerttler (20), Brodauf (6)).

Florent (13) isolierte 1953 aus Sperma von Bullen und aus der Vagina von Kühen apathogene Vibrionen. Er nannte diese Keime *Vibrio bubulus*. Sie bildeten reichlich Schwefelwasserstoff. Bryner und Frank (7) gelang es 1955, Vibrionen, die aus den Geschlechtsorganen von Bullen und Kühen, aus abortierten Rinderfoeten und aus Bullensperma isoliert waren, durch biochemische Untersuchungen in zwei Gruppen zu trennen: Ein Teil der Keime bildete Katalase, aber keinen Schwefelwasserstoff, die übrigen waren katalasenegativ aber bildeten Schwefelwasserstoff.

Auf Grund von klinischen Untersuchungen werden nur die katalasepositiven

Vibrionen als *V. foetus* bezeichnet und als pathogen angesehen, die katalasenegativen dagegen als saprophytär. Beide Formen können gleichzeitig beim selben Bullen vorkommen.

2. *Vibrio jejuni*

Jones und Little (32) ermittelten 1931 Vibrionen als Erreger einer heftigen, hauptsächlich im Winter auftretenden Enteritis bei Rindern. Sie nannten die gefundenen Keime *Vibrio jejuni* und es gelang ihnen durch Reinkulturen, diesen "schwarzen Durchfall" auf Kälber zu übertragen. (33)

Rolle, Mundt und Zintz (51) konnten bei Schlachtrindern und Schlachtkälbern mit Durchfall in zahlreichen Fällen im Duodenum und im Kot Vibrionen nachweisen. Diese werden als identisch mit *Vibrio jejuni* betrachtet (50). Bergey (4) erwähnt in der Ausgabe von 1948 *V. jejuni* nicht. Morphologisch ist *Vibrio jejuni* nicht von *Vibrio foetus* zu unterscheiden.

3. *Spirillum suis*.

Die "Dysenterie" der Schweine wird durch vibrionenähnliche Keime hervorgerufen, Doyle (11) gelang 1943 die Isolierung dieser als *Vibrio suis* oder *Spirillum suis* bezeichneten Bakterien und die künstliche Übertragung der Krankheit mit Reinkulturen.

Spirillen nach Bergey lang und schraubenförmig oder gekrümmt. Meist sind Volutingranula vorhanden. Die Bewegung erfolgt durch ein Büschel polständiger Geißeln (5 - 20), die an einem oder beiden Polen entspringen. Rolle und Mundt (49, 50) machten elektronenmikroskopische Aufnahmen von Spirillen aus dem Darminhalt von gesunden Schweinen. Dabei zeigte sich die bipolare Begeißelung der Keime: aus einem Pol entsprang ein Büschel von 4 Geißeln, aus dem anderen Pol eine Geißel. In jungen und alten Kulturen waren die Zellen granuliert.

Spirillen im Schweinedarm sind weit verbreitet, jedoch nicht ubiquitär (v. Ballmoos (2), Schmid und Klingler (52)(53)). Besonders pathogen sind die Spirillen für Ferkel und Läufer, bei erwachsenen Schweinen kommen auch latente Infektionen vor. Schmid (54) führt die

Ödemkrankheit, die infektiöse Gastro-Enteritis, den chronischen Durchfall der Schweine und das Ferkel-Ekzem auf die Infektion mit Spirillen, von Schmid "Vibrio coli" bezeichnet, zurück.

4. Vibrionenähnliche Keime.

Kutscher (36) gelang es 1894, aus Gewässern und Jauche 19 Stämme von vibrionenähnlichen Keimen zu isolieren.

Fretter (16) züchtete 1951 aus Flüssen, Brunnen und Tümpeln 64 verschiedene vibrionenähnliche Stämme. Rolle (50) gelang die Züchtung von Spirillen aus Schweinekot. Pathogene Eigenschaften dieser Bakterien konnten nicht nachgewiesen werden.

II. Züchtung

Zur Züchtung der Vibrionen wurden zahlreiche feste, flüssige und halbfeste Nährböden verwendet. Frisch isolierte Stämme sind besonders schwierig zu züchten, aber auch bei Laboratoriumsstämmen kann das Wachstum ohne erkennbare Ursache plötzlich aufhören (Harms und Hörter (24)).

1. Vibrio foetus

a) Feste Nährböden.

Auf festen Nährböden stellt *Vibrio foetus* besondere Anforderungen an den Sauerstoffgehalt der Luft.

Schon Smith (59) stellte fest, daß durch Sauerstoffverminderung das Wachstum der Vibrionen begünstigt wird. Beer (3) benützte als Sauerstoffverzehrer das *Bacterium prodigiosum*. Heute wird *Vibrio foetus* auf festen Nährböden vorwiegend im Zeißlertopf oder auch in evakuierbaren Brutschränken gezüchtet. In fast allen Laboratorien erfolgt Zugabe von Kohlensäure, je nach Forschungsstätte in der Menge schwankend zwischen 5 und 20%. Rolle und Mundt (49) konnten keine Unterschiede im Wachstum feststellen zwischen Keimen, die mit und solchen,

die ohne Kohlensäurezusatz bebrütet wurden. Reich, Morse und Wilson (48) kamen durch vergleichende Versuche zu dem Ergebnis, daß Kohlensäure in größerer Konzentration als in Luft nicht für das Wachstum der Vibrionen förderlich ist. Der Sauerstoffgehalt muß jedoch vermindert werden.

Die Bebrütung erfolgt 3 - 4 Tage bei 37° C.

Die verwendeten pH-Werte schwanken bei allen Nährböden je nach Laboratorium von pH 5,8 bis pH 7,5.

Auf Schrägagar ist das Wachstum der Vibrionen spärlich und unsicher (Smith (59), Lerche (39), Dedie und Voigt (10)). Durch Blutzusatz zum Kondenswasser und auf Ascitesagar kann dichteres Wachstum erreicht werden (Smith, Lerche (39), Hubrig (1956)).

Auf das Wachstum der Vibrionen wirkt sich Zusatz von Blut, Serum oder Ascitesflüssigkeit zum Nährboden günstig aus. (Berthelou und Tournut (5)). Auf Blutagar (Pferde-, Rinder-, Hammelblutagar) ist die Wuchsform und die Wachstumsdichte sehr verschieden. Dies beruht zum Teil auf der unterschiedlichen Beschaffenheit des Nährbodens und der Bebrütung. Nach Bergéy ist das Oberflächenwachstum von *Vibrio foetus* auf Blutagar dürrig, die Kolonien sind grauweiß und glänzend. Lerche (39) beschreibt die Kolonien als rotlaufähnlich, glasisch und zart.

Ein und derselbe Stamm kann Einzelkolonien bilden, aber auch zu einem grauweißlichen feuchten Film konfluieren (Harms und Hörter (24), Prier (46)).

Röllig und Mundt (49) konnten zwei verschiedene Wuchsformen beobachten; ein Teil der erhabenen kleinen Kolonien war farblos, ein Teil zeigte hellgelb-weiße Pigmentbildung.

Berthelou und Tournut (5) beschrieben die Kolonien als grau-blau, glänzend und schleimig.

Hubrig und Röhr (28) konnten auf 20% Pferdeblutagar charakteristisches Wachstum von katalasepositiven und katalasenegativen Vibrionen erzielen.

Die Weiterzüchtung von Blutplatte zu Blutplatte gelingt höchstens drei bis vier Tage lang, wenn die bewachsene Platte bei Zimmertemperatur aufbewahrt wird. Bei Aufbewahrung im Kühlschrank ist die Überimpfung noch nach maximal 9 Tagen möglich (Harms und Hörter (24)).

Auf Schokolade-Agar bei Bebrütung ohne Luftdruckminderung in Blechbehältern mit 10% CO₂-Zusatz erhielt Steger (57) optimales Wachstum. - Auch De-

d i é und V o i g t (10) verwendeten Röstblutagar zur Züchtung. Die Bebrütung erfolgte bei 15% CO₂-Zusatz.

Bei Gelatine Stichkulturen erhielt S t e g e r (57) nach zehntägiger Bebrütung schwaches Wachstum im Stichkanal.

Auf Bacto Nutrient Gelatine mit 0,1% Agar wuchsen die Vibrionen dicht (K u z d a s, M o r s e (37)).

Auf Natriumthioglykolat-Medium mit 2% - 3% Agar bildeten die Vibrionen dichte, bräunlich-mukoide Kolonien (H a n s e n (23), R o l l e und M u n d t (49)).

Auf Thiolmedium mit 2% Agar entwickeln sich Vibrionen gut (R o l l e, M u n d t (49)).

b) Flüssige und halbfeste Nährböden.

S m i t h und T a y l o r (59), auch L e r c h e (39), züchteten *V i b r i o f o e t u s* in Fleischbouillon mit Blutzusatz.

K a w a s h i m a (34) verwendet Rinderserumbouillon.

S t e g e r (57) züchtet Vibrionen neben anderen Nährböden in 1% Peptonwasser und 4% Peptonfleischwasser.

In Magermilch konnten H a r m s und H ö r t e r (24) *V i b r i o f o e t u s* züchten, wobei noch nach maximal 5 Monaten eine Überimpfung auf Blutplatten möglich ist. Auch D e d i é und V o i g t (9) züchteten Vibrionen in Magermilch.

In Eigelbbouillon konnten R o l l e und M u n d t (49) Wachstum von Vibrionen erreichen.

In Thiolnährböden mit 0,1% Agaranteilen nach H u d d l e s o n (30) zeigen die Vibrionen sehr gutes Wachstum. In diesem Medium bleiben die Keime bei Zimmertemperatur mindestens 150 Tage am Leben. Neben der Leberbouillon wird dieser Nährboden am häufigsten zur Züchtung von *V. f o e t u s* benutzt.

R o l l e und M u n d t (49) ersetzten den Thiolkomplex im Nährboden nach H u d d l e s o n durch Natriumthioglykolat oder Glutathion und erhielten gleich gutes Wachstum.

Als bester Nährboden für Vibrionen wird von vielen Forschern die Leber-

bouillon bezeichnet (D e d i ß und V o i g t (10), H u b r i g (25), S t e g e r (57) u.a.). Bei zuparaffinierten Röhrchen gelang S t e g e r (57) noch nach 9 Monaten die Überimpfung auf Blutplatten.

Agarzusätze zu flüssigen Nährböden von 0,21 - 0,075% sind optimal für Vibrionen (K u z d a s und M o r s e (37), H u b r i g (25)).

Im bebrüteten Hühnerei gelingt die Züchtung von *V. foetus* regelmäßig (J a n s e n, K u n s t (31)).

c) Wachstumssteigernde Nährbodenzusätze.

Durch verschiedene Zusätze zum Grundnährboden ist versucht worden, eine Wachstumssteigerung bei den Vibrionen zu erreichen.

O s b o r n e (53) erzielte deutlich vermehrtes Wachstum durch Zusatz von Corpus-luteum Extrakt, Progesteron oder Testosteron zum Thiolmedium.

P r i e r (46) erreichte eine Wachstumsverbesserung durch Zugabe von Thiamin zum Bacto-Tryptose-Agar.

G a u t h i e r (19) benützte einen Nährboden nach B r o w n, dessen Grundsubstanz Rinderherzbouillon mit Gelatinezusatz ist. Dazu geben sie Paraaminobenzoessäure, Cystein und Amidon.

H a n s e n und Mitarbeiter (23) setzen außerdem noch *Ac. thioglycolicum* zu.

A l e x a n d e r (1) bestimmte die Ausnutzung von Energiequellen durch Vibrionen. Dabei erwiesen sich unter den angegebenen Versuchsbedingungen als geeignete Energiespender: "Laktat, Pyruvat, Acetat, alpha-Ketoglutarate, Succinate, Fumarate, Malate, Aspartate, Asparagin, Glutamat und Prolin".

Kein Wachstum bewirkten: "Glukose, Hexosediphosphat, Glycerol, Glycerophosphat, Oxalacetat, Citrat, Isocitrat, Oxalsuccinat, Tartrat, Glycerin, Alanin, Threonin, Methionin, Histidin, Phenylalanin, Leucin, Lysin, Ornithin, Arginin und C y s t e i n".

Für die anderen Vibrionenarten werden im allgemeinen dieselben Nährböden und Kulturverfahren angewandt wie für *V. foetus*.

2. *Vibrio jejuni*.

Jones und Little (32, 33) züchteten den Keim auf Blutagar, später wurde Agar und Leptospirogenmedium verwendet.

Rollé, Mundt und Zintz (51) verwendeten zur Züchtung Peptonwasser mit Rinderherzzusatz und Leberbouillon.

3. *Spirillum suis*.

Die erste Reinzüchtung von *Spirillum suis* gelang Doyle 1948 (11) auf Blutagar. Die Bebrütung erfolgte dabei unter Kohlensäurezusatz. Die Spirillen bildeten bis zu stecknadelkopfgroße, punktförmige, graue Kolonien oder auch einen dichten Rasen. Bei Zimmertemperatur zerfielen die Keime auf der Platte nach 48 Stunden in kokkenartige Granula. (Doyle (11), Schmid und Klingler (52, 53) und v. Ballmoos (2)). Die Spirillen können durch Aufbewahrung der bewachsenen Platten im Kühlschrank 4 - 6 Wochen lebensfähig erhalten werden.

Rollé und Mundt (50) erhielten auf Blutagar, bei Bebrütung mit oder ohne Kohlensäurezusatz typische rotbraune mikrokokkenartige Kolonien.

Harms und Hörter (24) bebrüteten die Spirillen anaerob. Auf Blutagar waren die Kolonien in der Primärkultur rotlaufähnlich. Die Kolonien der Subkulturen konfluieren leicht und waren dann grauweiß mit einem rötlichen Schimmer.

Von den Platten, die bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden, waren nach 5 Tagen keine Subkulturen mehr möglich. Im Kühlschrank blieben die Spirillen 7 Tage lebensfähig.

Als spezifischen Nährboden für *Spirillum suis* verwendeten Harms und Hörter (24) eine Schweinedarmbrühe mit 1% Peptonzusatz. Das Wachstum hörte aber in der 2. Subkultur plötzlich auf.

Auch Nährbouillon und Serumbouillon wurden als Nährboden verwendet. In Leberbouillon war das Wachstum der Spirillen gut und die Keime blieben 9 Wochen lebensfähig (Steger (57)). Auch in steriler Magermilch entwickelten sich die Spirillen gut und waren bei zuparaffinierten Röhrchen 1 Jahr lang lebensfähig (Steger (57)).

4. Vibrionenähnliche Keime

Die vibrionenähnlichen Keime aus Jauche und Wasserproben stellen keine besonderen Anforderungen an den Nährboden.

Sie gedeihen gut in Peptonwasser, Agar und Gelatine und anderen üblichen Nährböden (K u t s c h e r (36), F r e t e r (16)).

III. Isolierung

Die Isolierung von *V. foetus*, *V. jejuni* und *Sp. suis* aus dem Untersuchungsmaterial wird vor allem auf Blutplatten, in halbflüssigem Thiolnährboden und in Leberbouillon, mit oder ohne Agarzusatz, durchgeführt.

Die Überimpfung erfolgt von einer Probe stets auf mehrere Nährböden. Trotz Verunreinigungen und anfänglicher Überwucherung der Vibrionen durch andere Keime können noch nach längerer Zeit, nach mehr als 2 Wochen (D e d i é und V o i g t (10), H u b r i g (25), G a u t h i e r (19)) die typischen Vibrionen erscheinen. Auch andere der für Vibrionen geeigneten Nährböden werden gelegentlich zur Anzüchtung benutzt.

Die Isolierung von vibrionenähnlichen Keimen aus Wasser führte F r e t e r (16) nach den amtlichen Vorschriften für die Cholera-Diagnose durch.

Auch K u t s c h e r (36) reicherte die Keime erst in Vorkulturen in 1% Peptonwasser an. Von dort überimpfte er die Keime in flüssige Gelatine und flüssigen Agar, die dann zu Platten gegossen wurden. Die Agarplatten wurden bei 37,5° C und die Gelatineplatten bei 22° C bebrütet.

Da die Begleitkeime die Vibrionen häufig überwuchern oder völlig unterdrücken, wurde auf verschiedene Weise versucht, das Wachstum dieser Keime zu verhindern, ohne die Vibrionen, vor allem handelt es sich um *V. foetus*, zu schädigen.

R o l l e und M u n d t (49, 50) erreichten durch Zusatz von 100 gamma/ml abgeschwächtem Streptomycin eine spezifische Hemmung der Begleitkeime. Als Nährboden verwendeten sie Natriumthioglykolatbouillon mit 0,1% Agar.

K a w a s h i m a (34) setzte den Nährboden 50 - 100 E/ml Penicillin G und 1 mg/ml Sulfathiazol zu.

T e r p s t r a (60) gelang es durch Alkylarylsulfonat-Zusatz zum Nährboden das Wachstum vieler grampositiver und gramnegativer Bakterien deutlich zu hemmen.

Das Schwärmen von *P. v u l g a r i s* konnte er durch Zusatz von 0,2 - 0,3% Aesculin verhindern.

Auf dem Selektivnährboden nach S t e g e r (57), der aus Rindfleischbouillon mit Agarzusatz besteht und als Hemmstoffe Äskulin und Natriumrizinoleat enthält, werden *C. p y o g e n e s* und *Br. a b o r t u s* völlig gehemmt, nicht dagegen *P. v u l g a r i s* *Ps. p y o c y a n e a*.

V a l l é (63) konnte keine Reinkultur erzielen, wenn eine Verunreinigung mit *E. c o l i* vorlag. Zusatz von Antibiotika, Serum anti-H und Bakteriophagen gegen *E. c o l i* blieben ohne Erfolg. K u z d a s und Mitarbeiter (37) entwickelten einen Selektivnährboden, der Ochsen-galle, Ethylviolett, Bacitracin, Polimyxin B-Sulfat und Actidione enthält. Aber auch hier werden *P. v u l g a r i s* und *Ps. a e r u g i n o s a* nicht gehemmt.

F l o r e n t (14) gibt zu Rinderherzbouillon mit Gelatinezusatz, im Verhältnis 1 : 40 000 in besonderen Fällen 1 : 20 000 Brillantgrün zu. *Ps. a e r u g i n o s a* und *P. v u l g a r i s* sind gegen Brillantgrün resistent.

R o l l e (50) gelang es durch Zusatz von Natriumazid zum Nährboden *P. v u l g a r i s* auszuschalten.

D e d i é und V o i g t (10) geben als eine Methode der Reinigung von Stämmen die Überimpfung in die Allantoishöhle von 9 Tagen bebrüteten Hühnereiern an.

Auch durch U-Rohr-Passagen in halbflüssigen Nährböden führten sie die Reinigung durch.

Das Schwärmen von *P. v u l g a r i s* wird auf der Blutplatte gehemmt durch Äthylalkoholdämpfe nach dem Verfahren von K e l l n e r (35).

G a u t h i e r (19) benützt zur Trennung von Vibrionen und anderen Keimen Filter, die je nach Keimart eine verschiedene Durchlaufzeit haben.

Bei stark verunreinigten Proben ist eine Isolierung nicht in allen Fällen durchführbar. Bei Bullen, die eine starke Besiedlung des Praeputiums mit *P. v u l g a r i s* und *Ps. a e r u g i n o s a* aufweisen, ist eine verlässliche bakteriologische Diagnose der *V. f o e t u s* Infektion nicht möglich. In solchen Fällen müssen mehrere Färsen durch diesen Bullen gedeckt

werden und die Vibrionen dann aus dem Cervix- und Vaginalsekret dieser Tiere herausgezüchtet werden (H u b r i g, W o h a n k a und G r ä n z (26)).

IV. Biochemische Eigenschaften und Differenzierung

1. *Vibrio foetus*

a) Gemeinsame Eigenschaften der katalasepositiven und katalasenegativen Stämme.

Frisch isolierte Stämme wachsen nicht auf Agarplatten. (B e r g e y (4), K a w a s h i m a (34)). Laborstämme bilden auf der Oberfläche von Agar spärliche, grauweiße, glänzende Kolonien. Unter der Oberfläche im Agar sind die Kolonien klein, gelb und undurchsichtig (4).

Auf Serumagarplatten ist das Wachstum spärlich (34).

Fleischbouillon wird schwach getrübt, es kann sich ein zähes, ringförmiges Häutchen bilden (4).

In Lackmusmilch wächst *V. foetus* nach B e r g e y nicht. Die Stämme, die in Lackmusmilch wuchsen, reduzierten Lackmus (P r i c e, P o e l m a, F a b e r (45)). Nach K u z d a s und M o r s e (37) wurde Lackmusmilch mit 0,1% Agarzusatz in 96 Stunden reduziert. Auf Kartoffelnährboden wächst *V. foetus* nicht (4). Indol wird nicht gebildet (4).

B e r g e y beschreibt das Wachstum auf Blutplatten als spärlich, eine Verflüssigung tritt nicht ein. Aus Kohlenhydraten wird kein Gas gebildet, Glukose, Laktose, Saccharose bleiben unverändert oder es tritt leichte Säuerung auf (4).

P r i c e, P o e l m a und F a b e r (45) prüften eine große Anzahl Zucker und Polyalkohole, sie wurden durch *V. foetus* nicht angegriffen. Auch andere Forscher untersuchten das Verhalten gegen Kohlenhydrate, in keinem Fall wird von einem Abbau berichtet. Aesculin wurde nicht angegriffen (S t e g e r (57)).

B r y n e r und F r a n k (7) und (44) K u z d a s (37) erhielten durch *V. foetus* die Reduktion von Nitrat zu Nitrit.

H u b r i g und W o h a n k a (26) und K a w a s h i m a (34) erhielten kein eindeutiges Ergebnis bei der Nitratreduktionsprobe. Die Voges-Proskauer-Methylrot-Probe fällt negativ aus. Die Nitroso-Indol Reaktion nach B i e - g e r t ist negativ (S t e g e r (57), (34)). In Gelatine-Stichkultur wächst *V. f o e t u s* nicht. (P r i c e, P o e l m a, F a b e r (45), K a w a s h i m a (34)).

S t e g e r (57) konnte schwaches Wachstum im Stichkanal erzielen. Auf Ge- latine ist das Wachstum dicht, Verflüssigung tritt nicht ein (57).

In Thiolnährböden erfolgt Ammoniakbildung, dadurch wurde der Ausgangs- pH-Wert maximal um 1,54 und minimal um 0,55 verändert. Die Prüfung erfolg- te, nachdem die 4 Tage bebrüteten Stämme 10 Monate lang bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden waren (57).

Ammoniakbildung erfolgte auch in 4% Peptonbouillon (S t e g e r). In halb- flüssiger Bouillon mit 8 - 11% Dextrosezusatz wächst *V. f o e t u s* (37) noch.

V. f o e t u s bildet keine Urease (37). Methylenblau wird nicht reduziert (57). Die optimale Temperatur ist nach B e r g e y 37°C . 55°C werden 5 Minuten lang ertragen (S m i t h und T a y l o r (59)). Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt werden nach S t e g e r nicht ertragen. Bei $5 - 6^{\circ}\text{C}$ ist die Vitalität deutlich gegenüber Kulturen bei Zimmertemperatur vermin- dert (59).

L e i d l und M a h r l a (38) stellten fest, daß Vibrionen gegen Tempe- raturen, wie sie bei der Spermatieffkühlung erreicht werden, resistent sind.

b) Unterschiedliche Eigenschaften der katalasepositiven und katalasenegati- ven Stämme.

M o r p h o l o g i s c h e und b i o c h e m i s c h e Untersuchungen wurden von B r y n e r und F r a n k (8) an 164 Vibrionenstämmen durch- geführt, die aus abortierten F o e t u s , aus Vaginalschleimproben von Kühen, aus Sperma und Praeputialspülproben von Bullen und aus den Geschlechtsorga- nen von Schlachttieren isoliert worden waren. Ein Teil der Stämme bildete Katalase und keinen Schwefelwasserstoff, während die übrigen Schwefelwasser- stoff aber keine Katalase erzeugten.

B r y n e r und F r a n k halten nur die Katalasepositiven für pathogen und bezeichnen nur solche als *V. f o e t u s*; die katalasenegativen Stämme,

die Schwefelwasserstoff bilden, halten sie für apathogen.

Gegen die Zuverlässigkeit dieser Differenzierungsmethode werden Zweifel laut:

T e r p s t r a (61) konnte pathogene Stämme züchten, die trotz reichlicher Schwefelwasserstoffbildung bei den infizierten Kühen zu Abort und Ausbildung von Agglutininen im Vaginalsekret führten.

K u z d a s und M o r s e (37) konnten katalasepositive Vibrionen aus Vaginalsekret und Bullensperma isolieren, aber auch aus der Erde, aus Wasser und aus Käse.

Bei den Rindern, die mit Sperma von Bullen besamt waren, bei welchen auf Grund der Differenzierungsergebnisse pathogene Vibrionen festgestellt wurden, konnten nicht immer Fälle von Sterilität oder Aborten nachgewiesen werden (M i t s c h e r l i c h (42)).

In Zweifelsfällen wäre es von großem Wert, die fraglichen Vibrionenstämme von Institut zu Institut auszutauschen, um die Proben unter völlig gleichen Bedingungen durchführen zu können.

In der Folgezeit konnte diese Differenzierung von katalasenegativen und katalasepositiven Vibrionen durch eine Reihe weiterer Unterschiede ergänzt werden.

B r y d e r und F r a n k (7,8) stellten Wachstumsunterschiede bei Tiefkulturen fest. Als Nährboden verwendeten sie Thioalbumin mit 0,5% Agarzusatz. Dabei wuchsen die katalasepositiven Vibrionen nur auf der Oberfläche des Nährmediums, während die katalasenegativen ebenso gut entlang dem Impfkanal wuchsen.

H u b r i g und R ö h r (28) züchteten die Keime auf 20% Pferdeblutagar (Ausgangswert 7,8) und bebrüteten die Platten 3 Tage lang bei einer 20%-igen Kohlensäurespannung.

Die katalasepositiven Vibrionen bildeten weiße, metallisch glänzende Kolonien. Die katalasenegativen dagegen gelb-weiße, gelb-grünliche bis ockerfarbene Kolonien.

H u b r i g und W o h a n k a (29) fanden in Leberbrühe mit 0,07% Agarzusatz typisches unterschiedliches Wachstum. Katalasepositive Vibrionen bildeten etwa 1 cm unter der Nährbodenoberfläche einen zarten grauen Schleier, der sich gegen die Mitte hin verliert. Bei katalasenegativen begann die Trübung dagegen schon dicht unter der Oberfläche, verdichtete sich in 1 cm Tiefe zu

einem dichten dunkelgrauen Ring, der etwa 1 cm tiefer langsam in den klaren Nährboden übergang.

K u z d a s und M o r s e (37) züchteten katalasepositive Vibrionen bei 15° C, katalasenegative wuchsen erst bei 20° C. Bei einer Konzentration von 3,5% NaCl im Nährboden wuchsen katalasenegative Vibrionen noch gut, während katalasepositive kein Wachstum mehr zeigten (37).

F l o r e n t (13) gelang es 1953 aus Bullensperma und aus Kühen Vibrionen zu isolieren, die er *V i b r i o b u b u l u s* nannte. Diese Keime verursachten keine Krankheiterscheinungen.

Im Gegensatz zu *V i b r i o f o e t u s* bildet *V i b r i o b u b u l u s* keine langen Ketten, er bildet nur kürzere Ketten, die gut beweglich sind. Frisch isolierte Stämme wachsen nur anaerob, sie werden aber allmählich mikroaerophil.

V i b r i o b u b u l u s bildet Schwefelwasserstoff. In Tiefgelatine erreichen die Kolonien 1 - 2 mm Durchmesser, sie sind durchsichtig und können im Zentrum gelblich-bräunlich werden. Peptonwasser wird leicht getrübt.

Auf Gelatine zeigt *V i b r i o b u b u l u s* dichtes Wachstum, es tritt keine Verflüssigung ein. Nitrat wird zu Nitrit reduziert. Sulfate und Sulfite werden nicht angegriffen.

In Bouillon wird Ammoniak gebildet. Die Keime sind für Meerschweinchen und Mäuse nicht pathogen.

Toxin- oder Hämolysinbildung findet nicht statt (13, 15, 62).

Zur Bestimmung der verschiedenen Vibrionenarten werden immer mehr auch serologische Reaktionen herangezogen. Schon S m i t h und T a y l o r (1919) untersuchten im Agglutinationsverfahren die isolierten Vibrionenstämmen. Versuche von P r i c e, P o e l m a und F a b e r (44, 45) ergaben, daß die Vibrionen eine komplizierte Antigenstruktur besitzen und nicht einheitlich sind.

W i i d i k und H l i d a r (66) konnten an 5 *V. f o e t u s*-Stämmen nachweisen, daß diese ein thermolabiles H-Antigen, ein thermostabiles O-Antigen und ein Kapselantigen (K) besitzen.

B r y n e r und F r a n k (7) führten Agglutinationsversuche mit Vibrionenstämmen durch, die auf ihre Katalaseaktivität geprüft waren. Seren, die

durch Immunisierung von Kaninchen mit katalasenegativen Vibrionen erzeugt worden waren, reagierten nur mit katalasenegativen, nicht mit katalasepositiven Stämmen.

Seren, die durch Immunisierung von Kaninchen mit katalasepositiven Vibrionen erzeugt worden waren, reagierten stark mit katalasepositiven Stämmen und nur wenig oder gar nicht mit katalasenegativen. Diese Ergebnisse wurden durch andere Forscher bestätigt: H u b r i g und W o h a n k a (26), H u b r i g, W o h a n k a und G r ä n t z (29).

M i t s c h e r l i c h und L i e s s (42a) führten die Differenzierung mittels der Komplementbindungsreaktion und des Agglutinationsverfahrens mit folgendem Ergebnis durch:

Mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion lassen sich Stämme der Art *V. foetus* in 2 verschiedene Typen differenzieren, von denen der eine durch den typenspezifischen Antigenfaktor 1, der andere durch den typenspezifischen Antigenfaktor 2 gekennzeichnet ist. Katalasenegative Vibrionen, die apathogenen Arten zugerechnet werden, besitzen einen eigenen, in der Komplementbindungsreaktion nachweisbaren Antigenfaktor 3, der den *Vibrio-foetus*-Stämmen nicht zukommt und es ermöglicht, die beiden Typen der Art *V. foetus* von apathogenen Vibrionenarten zu differenzieren.

Mit Hilfe des Agglutinationsverfahrens können, unter bestimmten angegebenen Versuchsbedingungen, katalasepositive und katalasenegative Vibrionenstämme, d.h. Stämme mit dem Antigenfaktor 1 und 2 von den Stämmen mit Antigenfaktor 3 unterschieden werden.

Durch klinische Beobachtungen und Beachtung der Herkunft des Untersuchungsmaterials, aus dem die Stämme herausgezüchtet sind, wird die Differenzierung gestützt.

B r y n e ~ und F r a n k (7) fassen die Unterschiede zusammen: Alle Vibrionen aus abortierten Foeten waren katalasepositiv. Die übrigen katalasepositiven Vibrionen werden auf Grund ihrer Pathogenität, Morphologie und ihres Wachstums als *V. foetus* angesprochen. Katalasepositive Vibrionen konnten nicht aus virginellen Kühen oder Bullen gezüchtet werden.

Katalasenegative Vibrionen werden nicht als *V. foetus* betrachtet, da keine Isolierung dieses Types aus abortierten Foeten erfolgte. Diese wurden aus Rindern und Bullen mit besten Befruchtungsergebnissen isoliert und auch aus virginellen Bullen. Sie verursachen keine Unfruchtbarkeit.

V. - f o e t u s - Stämme vom Rind und vom Schaf lassen sich nur durch serologische Untersuchungen voneinander unterscheiden. Die aus Schafen isolierten Vibrionen sind in ihrer Antigenstruktur nicht einheitlich. Sie sind serologisch von den aus Rindern isolierten verschieden, aber Kreuzagglutinationen kommen vor (40, 44, 45).

G a r m, L i n d q u i s t, S k j e r v e n (18) konnten bovine Vibriosis nicht auf Schafe übertragen.

2. V i b r i o j e j u n i

Von B e r g e y (4) wird V. j e j u n i nicht erwähnt.

K u z d a s und M o r s e (37) führten vergleichende biochemische Untersuchungen an Vibrionen auch mit 2 V. j e j u n i - Stämmen durch.

Gelatine wurde nicht verflüssigt.

In Lackmusmilch bildete nur 1 Stamm Alkali. Lackmusmilch mit 0,1% Gelatinezusatz wurde von beiden Stämmen in den oberflächlichen Abschnitten reduziert.

Indol wurde nicht gebildet.

Nitrat wird von V. j e j u n i nicht zu Nitrit reduziert, im Gegensatz zu V. f o e t u s und S p. s u i s. Ein V. f o e t u s - Stamm wuchs noch bei einer Dextrosekonzentration von 8 - 11% in halbflüssiger Bouillon, der andere Stamm wuchs nur bis zu einer Dextrosekonzentration von 2%.

Bei 3,5% NaCl-Zusatz zum Nährboden zeigte ein V. - j e j u n i - Stamm noch Wachstum, während der andere Stamm ebenso wie V. f o e t u s bei dieser Konzentration nicht mehr gedieh.

Beide Stämme waren katalasepositiv und bildeten keinen Schwefelwasserstoff.

3. S p i r i l l u m s u i s.

Versuche zur Bestimmung der biochemischen Eigenschaften von S p. s u i s haben vor allem H a r m s und H ö r t e r (24) und K u z d a s und M o r s e (37) durchgeführt.

Gelatine wurde nicht verflüssigt.

Lackmusmilch wurde nicht verändert, Lackmusmilch mit 0,1% Agarzusatz wurde

reduziert.

Indol wurde nicht gebildet. *Sp. suis* wie auch *V. foetus* reduzieren Nitrat zu Nitrit.

Sp. suis zeigte bei einer 8 - 11% Dextrosekonzentration noch Wachstum.

Bei einer NaCl-Konzentration von 3,5% wuchsen die Spirillen nicht mehr, auch nicht die katalasepositiven *V. foetus*-Stämme. Katalasenegative Vibrionenstämme zeigten dagegen noch Wachstum. Zucker wurde durch *Sp. suis* nicht angegriffen. *Harms* und *Hörtner* (24) konnten bei *Spirillum suis* Gärbildung in Leber-, Serum- und Nährbouillon, sowie in Milch und Gelatine beobachten. Durch Gallezusatz zum Nährboden gelang *Schneide* und *Morse* (37) die Differenzierung von *Sp. suis* und *V. foetus*. Als Grundmedium diente *Brockia*-Nährboden mit 0,1% Agar. Die Schweine-Dysenterie-Vibrionen entwickelten sich noch gut bei 10 - 25% Gallezusatz, auch bei 55 - 60% Gallezusatz zeigten sie noch schwaches Wachstum. Dagegen wurde *V. foetus* schon durch 10% Gallezusatz im Wachstum stark gehemmt.

Die *Sp. suis*-Stämme waren katalasepositiv und bildeten keinen Schwefelwasserstoff.

4. Vibrionenähnliche Keime.

Kutschera (36) prüfte eingehend morphologisch und biochemisch 19 vibrionenähnliche Stämme, die er aus Wasser, Jauche und Schweinedünger isolieren konnte.

Alle, außer einem Stamm, besaßen eine polständige Geißel, ein Stamm war bipolar begeißelt.

Mikroskopisch sind diese Keime nicht sicher von anderen Vibrionenarten zu unterscheiden.

Kutschera (36) prüfte das Wachstum aller Stämme in Bouillon, Peptonwasser, Milch, Blutseren, auf Kartoffelnährböden, auf der Gelatineplatte und in Gelatine-Stichkultur. Die Cholerarotreaktion wurde durchgeführt.

Ein Teil der Stämme zeigte dichtes Wachstum auf Kartoffelnährböden. Kein Stamm war für Meerschweinchen oder Mäuse pathogen. Auf Grund der biochemischen Unterschiede erfolgte die Einteilung der Stämme in 5 Gruppen:

- I. Gruppe: Gelatine nicht verflüssigend
- II. Gruppe: Gelatine langsam verflüssigend
- III. Gruppe: Proteusähnlich
- IV. Gruppe: Vibrio Metschnikoff
- V. Gruppe: Choleraähnlich.

Ein Stamm aus Schweinekot war proteusähnlich, ein Stamm choleraähnlich. Diese choleraähnlichen Vibrionen wachsen nach der Isolierung nur bei 22° C.

Alle Stämme wurden bei 22° C und bei 37° C gehalten. Ein Teil von ihnen zeigte anfangs nur bei 22° C Wachstum, in der 32. Generation wuchsen alle Stämme bei 37° C.

F r e t e r (16) konnte 64 Vibrionenstämme aus Flüssen, Brunnen und Tümpeln isolieren.

Alle waren bewegliche, gekrümmte gram-negative Stäbchen. Zum Vergleich untersuchte er auch indische Vibrionenstämme.

Drei der deutschen Stämme ergaben Säuerung bei Saccharose-, nicht bei Mannose- und Arabinosezusatz, 5 Stämme bildeten keine Säure aus Kohlenhydraten, alle anderen griffen Saccharose und Mannose an, nicht dagegen Arabinose. Die Voges-Proskauer-Reaktion fiel bei der Mehrzahl der Stämme positiv aus.

Gelatine wurde nicht verflüssigt.

Bei der Agglutination zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung innerhalb der deutschen Stämme, dagegen keine Beziehung zu den indischen.

C. Material und Methodik

I. Material

Die Untersuchungen wurden mit folgenden Stämmen durchgeführt:

1. Gruppe: Diese Stämme wurden dem Institut als
V. f o e t u s - Stämme übersandt.

Stamm-Nr.	Herkunft
1 - 16	aus dem Tierhygienischen Institut München
17 - 22	von Professor Mitscherlich
46 - 54	aus dem Veterinäramt Kiel
55	Vibrio-Stamm vom Schaf
56 - 58	aus dem Veterinäramt Bonn
61 - 70	aus der Geburtshilflichen Klinik München.

2. Gruppe:

- 59, 60, 72 aus den Genitalien von Kühen aus drei verschiedenen
Gegenden Deutschlands.

3. Gruppe:

- | | |
|---------------|-------------------|
| 23, 24; 42-45 | aus Rinderkot |
| 25 | aus Menschenstuhl |
| 40 | aus Hundekot |
| 41 | aus Schweinekot |

4. Gruppe:

- 26 - 39 aus Jauche verschiedener Tierarten.

Da neben frisch isolierten Stämmen auch Laborstämme zur Untersuchung kamen,
war das Material in seinem Verhalten nicht immer einheitlich.

II. Methodik

Alle Nährböden, mit Ausnahme der Blutplatten, wurden von mir selbst hergestellt.

Die Stammkulturen wurden in Leberbouillon gehalten und alle vier Wochen überimpft.

Die zur Untersuchung verwendeten Nährböden wurden jeweils mit einer Öse Material aus einer dicht gewachsenen Leberbouillon-Kultur beimpft.

In Agar und Gelatine wurden Stichkulturen angelegt. Die Bebrütung erfolgte im Brutschrank bei $37 - 38^{\circ}\text{C}$, Gelatine wurde bei Zimmertemperatur gehalten.

Die verwendeten Nährböden werden im einzelnen bei den entsprechenden Abschnitten angegeben. Die Herstellung erfolgte mit einigen Ausnahmen nach den bei H a l l m a n n (22) angegebenen Rezepten.

Zur Kontrolle wurden jeweils beimpfte Röhrchen ohne Zusätze, für die biochemischen Reaktionen unbeimpfte Röhrchen mitbebrütet.

Die Prüfung des Wachstums der Keime in flüssigen Nährböden wurde an einem Tropfen im Dunkelfeld oder bei Phasenkontrast vorgenommen.

Beurteilung:

- + bei ganz vereinzelter Keimen
-
- + bei einigen gut beweglichen Keimen in jedem Blickfeld
- ++ mäßiges Wachstum
- +++ sehr dichtes Wachstum

Gleichzeitig wurde auf Verunreinigung der Kulturen mit anderen Keimen geachtet.

Bei Verdacht auf Verunreinigungen und zur Kontrolle bei biochemischen Untersuchungen wurden die Stämme durch Überimpfung auf Blutplatten auf ihre Reinheit geprüft.

Herstellung der Verdünnungen der Nährbodenzusätze.

Zu Peptonwasser als Grundnährboden wurden vor dem Beimpfen jeweils 400 gamma/ccm Cystein zugesetzt.

120 mg Cystein werden in 10 ccm Aqua dest. gelöst, das sind in 0,1 ccm

1200 gamma.

0,1 ccm dieser Lösung pro 3 ccm Peptonwasser ergibt die Konzentration von 400 gamma pro ccm.

Die Lösung der Antibiotika und Hemmstoffe erfolgt in sterilem Aqua dest., von Bacitracin in steriler physiologischer Kochsalzlösung.

Für den Antibiotika-Plattentest wurde die Lösung so hergestellt, daß jeweils 0,05 ccm die angegebene Menge enthielten. 0,05 ccm Flüssigkeit wurden von den verwendeten Plättchen völlig aufgesaugt.

5 mg in 5 ccm Aqua dest. = 50 gamma in 0,05 ccm

1 : 1 verdünnt = 25 gamma in 0,05 ccm

Die Ausgangslösung 1 : 9 verdünnt ergibt 5 gamma in 0,05 ccm,

diese Lösung 1 : 4 verdünnt ergibt 1 gamma in 0,05 ccm.

In gleicher Weise wurden die Verdünnungen aller Nährbodenzusätze hergestellt.

Von Bacitracin wurde das "Diagnostic Buffered Bacitracin"

von Chas. Pfizer & Co. verwendet.

Paraxin: Chloramphenicol Boehringer

Aquacillin: comp. Bayer.

D. Eigene Untersuchungen

I. Biochemische und kulturelle Eigenschaften

1. Prüfung der Katalase- und Schwefelwasserstoffbildung

Die Versuche wurden durchgeführt, um zu ermitteln, ob eine Differenzierung der Stämme auf Grund der Katalase- und Schwefelwasserstoffbildung möglich ist.

a) Katalaseprobe nach Bryner und Frank (8), modifiziert nach Hubrig und Wohanka (27).

Versuchsordnung.

Die Stämme wurden drei Tage in Leberbouillon mit 0,1% Agarzusatz bei 37° C bebrütet.

Es wurden 5 ccm der dicht bewachsenen Kultur, 5 ccm unbeimpfte Leberbouillon und 5 ccm 1%ige H_2O_2 -Lösung in Röhrchen gefüllt. Diese mußten daraufhin möglichst rasch mit einem in der Mitte durchbohrten und mit einem Kapillarröhrchen versehenen Gummistopfen verschlossen und umgekehrt über einem 2. Röhrchen aufgestellt werden.

Entsprechend der entwickelten Gasmenge entweicht Flüssigkeit aus der Kapillare.

Die Zahlen in der Tabelle geben die verdrängte Flüssigkeitsmenge in ccm an.

Die endgültige Beurteilung erfolgte nach 40 Minuten.

Tabelle I: Katalase- und Schwefelwasserstoffbildung

Stamm No.	H ₂ S	Katalase ccm	Stamm No.	H ₂ S	Katalase ccm
1	-	10	61	+	-
2	-	10	62	+	-
4	-	10	63	+	-
5	-	10	64	+	-
6	-	10	65	+	-
7	-	10	68	+	-
8	-	10	69	+	-
9	-	10	70	+	-
10	-	10	59	-	8
11	-	10	60	-	8
12	-	10	72	-	8
13	-	10	23	-	10
14	-	10	24	-	6
15	-	12	42	-	4
16	-	10	43	-	5
17	-	10	44	-	5
19	-	10	45	-	5
20	-	10	25	-	15
21	-	8	40	-	3
22	-	6	41	-	3
46	-	3	26	-	3,5
47	-	2	27	-	3,5
48	-	2	28	-	4
49	-	2	29	-	4
50	-	6	30	-	5
51	-	3	31	-	2,5
52	-	2	32	-	2,5
53	-	2	33	-	5
54	-	5	34	-	5
56	-	5	35	-	5
57	-	5	36	-	6
58	-	5	37	-	3
55	-	6	38	-	6
			39	-	5

b) Schwefelwasserstoffprobe nach B r y n e r und F r a n k (8), modifiziert nach H u b r i g und W o h a n k a (27).

Versuchsordnung

Als Nährboden verwendete ich Nährbouillon, bestehend aus: 10 g Pepton, 5 g NaCl, ad 1000 ccm Fleischbrühe.

Diese Bouillon wird zu 8 ccm in Röhrchen abgefüllt und nach dem Sterilisieren mit 0,5 ccm einer dichten, 3 Tage alten Leberbouillon-Vibrionenkultur beimpft und bei 38° C bebrütet.

Der Nachweis von H_2S erfolgt durch Bleiazetatpapier, das zwischen Stopfen und Reagenzglas geklemmt wird.

Eine Schwärzung innerhalb von 24 Stunden gilt als positiv.

Ergebnis aus Tabelle I:

Aus diesem Versuch ergibt sich eine Einteilung der geprüften Stämme in 2 Gruppen:

Ein Teil der Stämme bildete Katalase und keinen Schwefelwasserstoff. Dies sind die meisten V. - f o e t u s - Stämme, die drei aus den Genitalien von Rindern stammenden Stämme und alle Kot- und Jauchestämme.

Dagegen bilden die V. - f o e t u s - Stämme 61 - 70 Schwefelwasserstoff und sind katalasenegativ.

Wird die Schwefelwasserstoffbildung in L e b e r b o u i l l o n geprüft, so tritt eine positive Reaktion nach 1 - 4tägiger Bebrütung auch bei katalasepositiven Vibrionenstämmen und bei einem Teil der Kot- und Jauchestämme auf.

2. Prüfung des Wachstums bei verschiedenen Temperaturen

Durch diesen Versuch sollte das Temperaturoptimum für die einzelnen Stämme ermittelt werden.

Weiterhin sollte geprüft werden, ob eine Differenzierung der Stämme auf Grund ihres Verhaltens bei verschiedenen Temperaturen möglich ist.

Versuchsanordnung

Als Nährboden diente Leberbouillon mit einem Wert von pH 7,0. Die Stämme wurden gehalten bei: 38°C , 22°C , 5°C ; außerdem für 24 Stunden bei 46°C und anschließender Bebrütung bei 38°C für 12 Tage.

Die Ergebnisse sind in Tabelle II aufgeführt.

Bei 38°C gedeihen alle Vibrionen-, Kot- und Jauchestämme, nachdem sie sich adaptiert haben, gut.

Die Stämme 59, 60, 72 sind nach 24 Stunden in Leberbouillon nicht mehr gewachsen. Diese 3 Stämme wachsen jedoch in Bouillon oder Peptonwasser bei 38°C gut. (Siehe auch Versuche mit Leberbouillon, Tabelle V).

Die Jauchestämme wuchsen frisch isoliert nur bei Temperaturen bis zu etwa 28°C . Bei höheren Temperaturen wurden sie in einigen Stunden abgetötet.

Im Laufe des Sommers adaptierten sie sich jedoch an die höheren Temperaturen, so daß sie nach einigen Monaten auch bei 38°C dichtes Wachstum zeigten (siehe auch K u t s c h e r (36)).

Bei 22°C wachsen die V. - f o e t u s - Stämme nicht innerhalb von 24 Stunden.

Dagegen zeigen die Jauche- und Kotstämme innerhalb 24 Stunden dichtes Wachstum.

Frisch isolierte Vibrionenstämme wachsen bei 22°C nicht, adaptierte Stämme wachsen bei 22°C , jedoch langsamer als bei Bruttemperatur.

Die Gruppe 59, 60, 72 wächst bei 22°C langsam und spärlich.

Bei 5°C wachsen die Vibrionenstämme nicht, auch nicht die Gruppen 59, 60 und 72.

Die Kot- und Jauchestämme zeigen bei 5°C dichtes Wachstum.

Alle Stämme wurden unmittelbar nach dem Beimpfen für 24 Stunden einer Temperatur von 47°C ausgesetzt und anschließend 12 Tage bei 38°C bebrütet.

Durch die Temperatur von 46°C waren sämtliche geprüften Keime abgetötet.

Tabelle II: Wachstum der Stämme bei verschiedenen Temperaturen

Stamm No.	38°			22°			5°		
	24 Stunden	48 Std.	13 Tage	24	48	13	24	48	13
1	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
2	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
3	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
4	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
5	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
6	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
7	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
8	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
9	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
10	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
11	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
12	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
13	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
14	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
15	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
16	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
17	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
19	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
20	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
21	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
22	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
46	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
47	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
48	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
49	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
50	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
51	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
52	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
53	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
54	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
56	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
57	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
58	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-
55	+++	+++	+++	-	+	+++	-	-	-

Durch Prüfung des Wachstums der frisch isolierten Stämme bei 38°C , 22°C und 5°C ist eine Aufteilung in 4 Gruppen möglich: V. - f o e t u s - Gruppe, Gruppe 59, 60, 72, Kotstämme und Jauchestämme.

Bei Laboratoriumsstämmen verwischen sich diese Unterschiede im Laufe der Zeit.

3. Prüfung des Wachstums bei verschiedenen pH-Werten

Der Versuch wurde durchgeführt um:

- 1.) den optimalen pH-Wert für die Züchtung der einzelnen Stämme zu ermitteln.
- 2.) zu prüfen, ob eine Differenzierung der Stämme auf Grund ihres Verhaltens bei verschiedenen pH-Werten möglich ist.
- 3.) festzustellen, ob die Keime durch ihre Stoffwechseltätigkeit den pH-Wert des Nährbodens verändern.

Versuchsordnung.

Nährboden: Rindfleischbouillon mit Zusatz von 0,01 g Natriumthioglykolat auf 1000 ccm. Bebrütung: 15 Tage bei 38°C .

Der Nährboden wurde auf die pH-Werte 5,1; 7,1; 8,6 und 9,1 eingestellt.

Die Messung des pH-Wertes erfolgte mit dem Jonometer.

Ergebnis aus Tabelle III:

- 1.) Sämtliche Stämme zeigen beim pH-Wert 7,1 gutes Wachstum. In der Folgezeit wurden alle Nährböden ungefähr auf diesen pH-Wert eingestellt.
- 2.) Auf Grund des unterschiedlichen Verhaltens bei den verschiedenen pH-Werten ist eine Differenzierung der einzelnen Gruppen möglich.

Bei pH 5,1 wachsen die V. - f o e t u s - Stämme, sowie die Stämme 59, 60 und 72 und die Mehrzahl der Kot- und Jauchestämme nicht.

Bei pH 8,6 ist die Unterscheidung der V. f o e t u s - von den Rinderkot- und Jauchestämmen möglich.

Bei diesem pH-Wert wachsen nicht die V. f o e t u s - Stämme sowie die aus Menschenstuhl, Hunde- und Schweinekot isolierten Stämme (25, 40, 41).

Dichtes Wachstum zeigen dagegen die Stämme 59, 60, 72 sowie alle Rinderkot- und Jauchestämme.

Bei pH 9,1 wachsen die V. f o e t u s - Stämme und die Stämme 25, 40 und 41

nicht mehr.

Dichtes Wachstum zeigen dagegen die Stämme 59, 60 und 72, alle Rinderkot- und ein Teil der Jauchestämme.

Zwischen dem Wachstum nach 24 Stunden und dem nach 3 Tagen ergaben sich kaum Unterschiede. Nach 15 Tagen sind nur noch wenige Vibrionenstämme gewachsen. Die Gruppe 59, 60, 72, alle Kot- und Jauchestämme zeigen nach 15 Tagen noch Wachstum, am dichtesten bei pH 7,1, spärlicher bei pH 8,6 und 9,1.

3.) Änderung des pH-Wertes.

Nach 15 Tagen Bebrütung wurde der pH-Wert der Röhrchen gemessen, die zu Beginn des Versuches auf den pH-Wert 7,1 eingestellt worden waren.

Die einzelnen Gruppen hatten den pH-Wert verschieden stark verändert, alle Stämme bildeten Alkali.

Die geringste Alkalibildung zeigten die katalasenegativen Vibrionenstämme. Sie hatten den pH-Wert von 7,1 zu 7,2 - 7,8 verändert. Die katalasepositiven Vibrionenstämme bewirkten einen End-pH-Wert von 8 - 8,5. Die Kot- und Jauchestämme bildeten im stärkeren Maße Alkali als die V. f o e t u s - Stämme: Sie hatten einen End-pH-Wert zwischen 8,5 und 9 erreicht. Die Gruppen 59, 60 und 72 zeigten die stärkste Alkalibildung. Der End-pH-Wert war 9,5.

Tabelle III: Wachstum bei verschiedenen pH-Werten

	24 Std.				3 Tage				15 Tage				pH nach 15 Tagen
	5,1	7,1	8,1	9,1	5,1	7,1	8,6	9,1	5,1	7,1	8,6	9,1	Ausgangs- pH 7,1
1	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
2	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
3	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
4	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8,5
5	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
6	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
7	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
8	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
9	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8,5
10	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
11	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8,5
12	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+	-	-	8
13	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
14	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
15	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
16	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
17	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
19	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
20	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
21	+	+++	+	-	+	+++	-	-	+++	-	-	-	8
22	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
46	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8,5
47	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8,5
48	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8,5
49	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	9
50	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
51	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	7,8
52	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8,5
53	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8,5
54	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
56	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
57	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
58	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8
55	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	8

Tabelle III: Fortsetzung

	24 Std.				3 Tage				15 Tage					
	pH	5,1	7,1	8,6	9,1	5,1	7,1	8,6	9,1	5,1	7,1	8,6		9,1
61	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	+	-	-	7,8
62	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	7,8
63	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	++	-	-	7,8
64	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	7,2
65	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	7,2
68	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	++	-	-	7,8
69	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,8
70	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	7,8
59	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	-	+	+	-	9,5
60	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	-	+	+	-	9,5
72	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	-	-	+	+	9,5
23	-	+++	++	++	-	++	++	++	-	-	-	+	+	9
24	-	+++	++	+	-	++	++	++	-	-	-	+	+	9
42	-	+++	++	+	-	+++	++	+	-	-	+	+	-	8,5
43	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	-	+	+	-	8,5
44	+	+++	+++	+++	++	+++	++	+	-	-	+	+	-	8,5
45	-	+++	+++	+++	-	+++	++	++	-	-	-	+	+	9
25	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	9
40	+++	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	+	-	-	8,5
41	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	7,5
26	+	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	9
27	+	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	9
28	-	+++	+++	-	-	+++	+++	-	-	-	+++	+	-	9
29	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+	+	9
30	-	+++	+++	-	-	+++	+++	-	-	-	+++	+	-	9
31	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+	+	9
32	-	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+	++	9
33	-	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+	++	9
34	-	+++	+++	-	-	+++	+++	-	-	-	+++	+	++	9
35	-	+++	+++	-	-	+++	+++	-	-	-	+++	+	-	9
36	-	+++	+++	-	-	+++	+++	-	-	-	+++	+	-	9
37	-	+++	+++	+	-	+++	+++	-	-	-	+++	+	-	9
38	-	+++	+++	-	-	+++	+++	-	-	-	+++	+	+	9
39	-	+++	+++	+	-	+++	+++	-	-	-	+++	+	-	9

4. Prüfung des Wachstums in Peptonwasser

Zweck des Versuches war, zunächst zu ermitteln, ob sich in Peptonwasser ein unterschiedliches Verhalten der geprüften Stämme ergibt.

Außerdem sollte untersucht werden, ob Peptonwasser ein geeigneter Nährboden für die geprüften Keime ist, oder ob der Zusatz eines Wuchsstoffes erforderlich ist.

Als Wuchsstoff wurde Cystein verwendet.

Versuchsordnung.

Nährboden: Peptonwasser. Pepton Witte und Pepton Difco.

pH 7,1 Bebrütung: 48 Stunden bei 38° C.

Zusatz von 400 gamma Cystein pro ccm.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tabelle IV zusammengestellt.

In Peptonwasser mit Zusatz von 400 gamma Cystein/pro ccm wachsen alle Stämme dicht.

In Peptonwasser ohne Cysteinzusatz wachsen die V. f o e t u s - Stämme nicht.

Dichtes Wachstum zeigen dagegen die Stämme 59, 60, 72 und die Kot- und Jauchestämme. Nur der Hundekot- und Schweinekotstamm wächst spärlich.

Ein Unterschied zwischen Pepton Witte und Pepton Difco ergab sich bei diesem Versuch nicht.

5. Wachstum in Pferde- und Rinderleberbouillon und in Hirnbrei.

Da Rinderleberbouillon zur Züchtung von Vibrionen besonders geeignet ist, wurde untersucht, ob bei Verwendung von Pferdeleberbouillon Wachstumsunterschiede auftreten, die zur Gruppierung ausgenützt werden können.

Die Eignung des Hirnbreis als Nährboden im Vergleich zur Leberbouillon wurde untersucht und gleichzeitig die Bildung von Schwefelwasserstoff in Hirnbrei geprüft.

Tabelle IV: Wachstum der Stämme in Peptonwasser

St. No.	Witte	Difco	+ Cystein	St. No.	Witte	Difco	+ Cystein
1	-	-	+++	59	+++	+++	+++
2	-	-	+++	60	+++	+++	+++
3	-	-	+++	72	+++	+++	+++
4	-	-	+++	23	++	++	+++
5	-	-	+++	24	++	++	+++
6	-	-	+++	42	+++	+++	+++
7	-	-	+++	43	+++	+++	+++
8	-	-	+++	44	+++	+++	+++
9	-	-	+++	45	+++	+++	+++
10	-	-	+++	25	+++	+++	+++
11	-	-	+++	40	+	+	+++
12	-	-	+++	41	+	+	+++
13	-	-	+++	26	+++	+++	+++
14	-	-	+++	27	+++	+++	+++
15	-	-	+++	28	+++	+++	+++
16	-	-	+++	29	+++	+++	+++
17	-	-	+++	30	+++	+++	+++
19	-	-	+++	31	+++	+++	+++
20	-	-	+++	32	+++	+++	+++
21	-	-	+++	33	+++	+++	+++
22	-	-	+++	34	+++	+++	+++
46	-	-	+++	35	+++	+++	+++
47	-	-	+++	36	+++	+++	+++
48	-	-	+++	37	+++	+++	+++
49	-	-	+++	38	+++	+++	+++
50	-	-	+++	39	+++	+++	+++
51	-	-	+++				
52	-	-	+++				
53	-	-	+++				
54	-	-	+++				
55	-	-	+++				
56	-	-	+++				
57	-	-	+++				
58	-	-	+++				
59	-	-	+++				
60	-	-	+++				
61	-	-	+++				
62	-	-	+++				
63	-	-	+++				
64	-	-	+++				
65	-	-	+++				

Versuchsanordnung.

Nährboden: Pferdeleber- und Rinderleberbouillon.

pH 7,1 Bebrütung bei 38^o C.

Hirnbrei nach H i b l e r (Zbl. für Bakt. Orig. I 25,602,1899)

modifiziert: a) Frisches Gehirn und Peptonwasser 2 : 1

b) Frisches Gehirn und Peptonwasser mit 0,05%

Ferrosulfat 2 : 1.

pH 7,1 Bebrütung bei 38^o C.

Entstehender H_2S bildet mit dem Organeisen des Gehirns Eisen-
sulfid. Prüfung der Schwärzung des Nährbodens nach 14 Tagen.

Ergebnis aus Tabelle V:

Ein Unterschied im Wachstum auf Pferde- und Rinderleberbouillon ergab sich bei keinem der geprüften Stämme.

Die Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Stämme ist verschieden. Das langsamste Wachstum zeigen die katalasenegativen Vibrionen, die nach 8 Stunden erst sehr spärlich gewachsen sind. Etwas rascher wachsen die katalasepositiven Vibrionen. Dagegen sind die Kotstämme und ein Teil der Jauchestämme nach 8 Stunden schon dicht gewachsen.

Nach 24 Stunden sind alle Stämme, außer der Gruppe 59, 60, 72 dicht gewachsen. Diese 3 Stämme unterscheiden sich in ihrem Wachstum in Leberbouillon von allen übrigen geprüften Keimen.

Sie haben ihre optimale Wachstumsdichte nach 8 Stunden erreicht. Dabei verändern sie den pH-Wert der Leberbouillon vom Ausgangs-pH-Wert 7,0 bis zu durchschnittlich 5,4 und sterben dabei ab. Nach 24 Stunden sind keine beweglichen Keime mehr im Nährboden vorhanden.

Im Hirnnährboden nach H i b l e r wachsen ebenfalls alle geprüften Stämme, aber nicht so üppig wie in Leberbouillon.

Bei der mikroskopischen Prüfung stört der trübe Nährboden und die Bewegung der Hirnpartikelchen. Als Nährboden ist für Vibrionen Leberbouillon vorzuziehen.

Es trat keine Schwärzung des Nährbodens auf, auch nicht bei Zusatz von Ferrosulfat.

Tabelle V: Wachstum im Pferde- und Rinderleberbouillon und in Hirnbrei

Stamm No.	8 Stunden		24 Stunden		Hirn 24 St.
	Leber Pferd	Leber Rind	Leber Pferd	Leber Rind	
1	++	++	+++	+++	++
2	++	++	+++	+++	++
3	++	++	+++	+++	++
4	+	+	+++	+++	++
5	++	++	+++	+++	++
6	++	++	+++	+++	++
7	++	++	+++	+++	++
8	++	++	+++	+++	++
9	++	++	+++	+++	++
10	++	++	+++	+++	++
11	++	++	+++	+++	++
12	++	++	+++	+++	++
13	++	++	+++	+++	++
14	++	++	+++	+++	++
15	++	++	+++	+++	++
16	++	++	+++	+++	++
17	++	++	+++	+++	++
19	++	++	+++	+++	++
20	++	++	+++	+++	++
21	++	++	+++	+++	++
22	++	++	+++	+++	++
46	+	+	+++	+++	++
47	+	+	+++	+++	++
48	+	+	+++	+++	++
49	+	+	+++	+++	++
50	+	+	+++	+++	++
51	+	+	+++	+++	++
52	+	+	+++	+++	++
53	+	+	+++	+++	++
54	+	+	+++	+++	++
56	+	+	+++	+++	++
57	+	+	+++	+++	++
58	+	+	+++	+++	++

Fortsetzung Tabelle V:

Stamm No.	8 Stunden		24 Stunden		Hirn
	Leber Pferd	Leber Rind	Leber Pferd	Leber Rind	24 St.
55	+	+	+++	+++	++
61	+	+	+++	+++	++
62	+	+	+++	+++	++
63	+	+	+++	+++	++
64	+	+	+++	+++	++
65	+	+	+++	+++	++
68	+	+	+++	+++	++
69	+	+	+++	+++	++
70	+	+	+++	+++	++
59	+++	+++	-	-	++
60	+++	+++	-	-	++
72	+++	+++	-	-	++
23	+++	+++	+++	+++	++
24	+++	+++	+++	+++	++
42	+++	+++	+++	+++	++
43	+++	+++	+++	+++	++
44	+++	+++	+++	+++	++
45	+++	+++	+++	+++	++
25	+++	+++	+++	+++	++
40	++	++	+++	+++	++
41	++	++	+++	+++	++
26	++	++	+++	+++	++
27	+	+	+++	+++	++
28	+	+	+++	+++	++
29	+	+	+++	+++	++
30	+	+	+++	+++	++
31	+	+	+++	+++	++
32	+	+	+++	+++	++
33	+	+	+++	+++	++
34	+	+	+++	+++	++
35	+	+	+++	+++	++
36	+	+	+++	+++	++
37	+	+	+++	+++	++
38	+	+	+++	+++	++
39	+	+	+++	+++	++

6. Wachstum in Gelatine.

Der Versuch wurde durchgeführt um zu prüfen, ob die Keime auf Gelatine ohne und mit Natriumthioglykolat-Zusatz wachsen und ob Verflüssigung der Gelatine eintritt.

Versuchsordnung.

Nährboden: a) Gelatine: 1000 ccm Aqua dest., 120 g Gelatine, 3,0 g Fleisch-extrakt, 5,0 g Pepton.

b) 10 gamma/ccm Natriumthioglykolat.

pH 7,2. Anlegung von Stichkulturen, Aufbewahrung bei Zimmer-temperatur. Prüfung des Wachstums nach 4 und 10 Tagen und nach 6 Wochen. Die Röhrchen wurden zuparaffiniert.

Tabelle VI: Wachstum in Gelatine

St.Nr.	Gelatine	Gelatine + Nathio.	St.Nr.	Gelatine	Gelatine + Nathio.
7	+	+	59	+	+
9	+	+	23	+	+
48	+	+	43	+	+
54	+	+	25	+	+
55	+	+	41	-	-
56	+	+	28	+	+
61	+	+	36	+	+
70	+	+			

Der Versuch wurde mit einer Auswahl von Stämmen durchgeführt. Zwischen dem Wachstum auf Gelatine und auf Gelatine mit Zusatz von Natriumthioglykolat bestand kein Unterschied. Der Schweinekotstamm (41) konnte auf diesem Nährboden nicht zum Wachsen gebracht werden, der Ovis-Stamm (55) wuchs nicht regelmäßig. Alle übrigen geprüften Stämme wuchsen innerhalb von 4 Tagen und wiesen auch nach 6 Wochen noch gut bewegliche Keime auf. Verflüssigung der Gelatine trat in keinem Fall auf.

7. Wachstum in Agar.

Im Vergleich zum Gelatinenährboden interessierte auch das Verhalten in einem festen Nährboden.

Parallel dazu wurde ein Versuch angesetzt, durch Gallezusatz zum Agarnährboden eine spezifische Hemmung von Begleitkeimen oder Vibrionen zu erzielen. Die Beschreibung der Versuchsanordnung und die Tabelle befinden sich auf Seite 57.

Die katalasen negativen Vibrionen wachsen nicht auf diesem Nährboden, alle übrigen Stämme wachsen innerhalb von 4 Tagen.

8. Wachstum bei Harnstoffzusatz.

Der Versuch wurde durchgeführt, um die Möglichkeit einer Differenzierung der Vibrionen und vibrionenähnlichen Keime durch Harnstoffzusatz zum Nährboden zu prüfen.

Versuchsanordnung.

Nährboden: Peptonwasser mit Cysteinzusatz,
pH: 7,1 Bebrütung: 24 Stunden bei 38° C.

Die Harnstofflösung wurde mittels Bakterienfilter entkeimt und unmittelbar vor dem Beimpfen jedem Röhrchen in der angegebenen Konzentration zugesetzt.

Tabelle VII: Wachstum in Peptonwasser mit Harnstoffzusatz

Stamm No.	Kon- trolle	1%	5%	Stamm No.	Kon- trolle	1%	5%
1	+++	+++	-	55	+++	+	-
2	+++	+++	-	56	+++	++	-
3	+++	+++	-	57	+++	++	-
4	+++	+++	-	58	+++	++	-
5	+++	+++	-	59	+++	+	-
6	+++	+++	-	60	+++	+	-
7	+++	+++	-	72	+++	+	-
8	+++	+++	-	23	+++	+++	++
9	+++	+++	-	24	+++	+++	+
10	+++	+++	-	42	+++	+++	+
11	+++	+++	-	43	+++	+++	++
12	+++	+++	-	44	+++	+++	-
13	+++	+++	-	45	+++	+++	+
14	+++	+++	-	25	+++	+++	++
15	+++	+++	-	40	+++	+++	+
16	+++	+++	-	41	+++	+++	+
17	+++	+++	-	26	+++	+++	++
19	+++	+++	-	27	+++	+++	++
20	+++	+++	-	28	+++	+++	++
21	+++	+++	-	29	+++	+++	++
22	+++	+++	-	30	+++	+++	+
46	+++	+	-	31	+++	+++	+
47	+++	+	-	32	+++	+++	+
48	+++	+	-	33	+++	+++	+
49	+++	+	-	34	+++	+++	+
50	+++	+	-	35	+++	+++	+
51	+++	+	-	36	+++	+++	+
52	+++	+	-	37	+++	+++	+
53	+++	+	-	38	+++	+++	+
54	+++	+	-	39	+++	+++	+

Ergebnis aus Tabelle VII

Aus diesem Versuch ergibt sich keine deutliche Differenzierung der Stämme.

Durch 1% Harnstoff wurden ein Teil der Vibrionen im Wachstum gehemmt, ebenso die Gruppen 59, 60 und 72. Alle übrigen Stämme blieben unbeeinflusst.

Bei 5% Harnstoff wuchsen die *V. f o e t u s* - Stämme und die Gruppen 59, 60, 72 nicht mehr.

Die Kot- und Jauchestämme wachsen noch spärlich.

Die katalasennegativen Vibrionen wurden in diesem Versuch nicht geprüft.

9. N i t r a t r e d u k t i o n.

Manche Vibrionenarten, auch Choleravibrionen, reduzieren Nitrat zu Nitrit.

Es wurde das Verhalten der 72 Vibrionen- und vibrionenähnlichen Stämme gegenüber Nitrat geprüft.

Versuchsordnung.

Nährboden: Peptonwasser mit Cysteinenzusatz und Zusatz von 0,15 g

Kaliumnitrat / 100 ccm.

pH 7,1 Bebrütung: bei 38° C.

Prüfung nach 24 Stunden und nach 4 Tagen.

Reagens: Angesäuerte Jodzinkstärkelösung.

Bei Vorhandensein von Nitrit tritt Blaufärbung auf.

Kontrollstämme mit positiver Nitritbildung: *E. Coli*-Stamm Mutaflor und 1115.

Ergebnis:

Bei der Prüfung der Nitratreduktion wurden unter völlig gleichen Versuchsbedingungen bei denselben Stämmen verschiedene Ergebnisse erzielt.

Die katalasennegativen und H_2S -positiven Stämme ergaben in keinem Fall eine Reduktion von Nitrat zu Nitrit.

Alle übrigen Stämme reduzierten Nitrat zu Nitrit, aber nicht regelmäßig.

Die beiden *E. c o l i* Kontrollstämme ergaben regelmäßig Nitratreduktion.

10. Indolbildung.

Manche Vibrionenarten, auch Choleravibrionen, bilden Indol. Es wurde das Verhalten der 72 Vibrionen- und vibrionenähnlichen Stämme gegenüber Indol geprüft.

Versuchsordnung.

Die Indolbildung wurde in zwei verschiedenen Nährböden untersucht.

- 1.) Peptonwasser mit Cysteinzusatz
- 2.) Spezialnährböden für die Indolbildung:
Trypsinverdaute Bouillon
Reagens: Dimethylaminobenzol
pH 7,2 Bebrütung: 4 Tage bei 38° C.

Kontrolle mit positiver Indolbildung: E. coli - Stämme M u t a f l o r und 1115.

Ergebnis aus Tabelle VIII:

Alle geprüften Vibrionen und vibrionenähnlichen Keime bildeten in beiden Nährböden kein Indol.

11. Nitroso-Indol-Reaktion.

Choleravibrionen ergeben eine positive Nitroso-Indol-Reaktion. Der Versuch wurde mit einer Auswahl von Stämmen durchgeführt.

Versuchsordnung.

Nährboden: wie für die Nitratreduktion

Peptonwasser mit Cysteinzusatz und Zusatz von 0,15 g
Kaliumnitrat / 100 ccm.

pH 7,1 Bebrütung: bei 38° C

Prüfung nach 7 Tagen.

Reagens: Konzentrierte H_2SO_4 .

Tabelle VIII: Indolbildung

Stamm Nr.	Indol	Stamm Nr.	Indol
1	-	61	-
2	-	62	-
3	-	63	-
4	-	64	-
5	-	65	-
6	-	68	-
7	-	69	-
8	-	70	-
9	-	59	-
10	-	60	-
11	-	72	-
12	-	23	-
13	-	24	-
14	-	42	-
15	-	43	-
16	-	44	-
17	-	45	-
19	-	25	-
20	-	40	-
21	-	41	-
22	-	26	-
46	-	27	-
47	-	28	-
48	-	29	-
49	-	30	-
50	-	31	-
51	-	32	-
52	-	33	-
53	-	34	-
54	-	35	-
56	-	36	-
57	-	37	-
58	-	38	-
55	-	39	-
		Coli	+
		Coli	+

Tabelle IX: Nitroso - Indol - Reaktion

Stamm-Nr.	Stamm-Nr.	Stamm-Nr.
9 -	46 -	23 -
10 -	47 -	24 -
11 -	51 -	42 -
12 -	52 -	43 -
13 -	53 -	44 -
14 -	54 -	45 -
15 -	55 -	25 -
16 -	56 -	40 -
17 -	57 -	41 -
19 -	58 -	
20 -	59 -	
21 -	60 -	
22 -	72 -	

Alle geprüften Stämme gaben eine negative Nitroso-Indol-Reaktion.

12. Voges - Proskauer - Probe.

Die VP₂-Probe wurde nun mit einer Auswahl von Stämmen vorgenommen. Die Reaktion beruht auf dem Nachweis von Acetylmethylcarbaminol, das als Zwischenprodukt beim Kohlenhydratabbau entsteht.

Versuchsanordnung.

Nährboden: Peptonwasser mit Traubenzucker und Dikaliumphosphat,
mit Cystein Zusatz.

pH 7,2 Bebrütung: 7 Tage bei 38° C.

Reagens: 10 % KOH - Lösung.

Bei positivem Ausfall tritt Rotfärbung auf, diese wird durch Erwärmen verstärkt.

Kontrollstamm: *Aerobacter aerogenes*.

Tabelle X: VP -Probe

Stamm-Nr.	Stamm-Nr.	Stamm-Nr.
1 -	59 -	33 -
2 -	60 -	34 -
3 -	23 -	35 -
4 -	24 -	36 -
5 -	25 -	37 -
6 -	26 -	38 -
7 -	27 -	39 -
8 -	28 -	Aerob. +
9 -	29 -	Aerob. +
10 -	30 -	
21 -	31 -	
22 -	32 -	

Alle geprüften Vibrionen und vibrionenähnlichen Stämme ergaben eine negative VP -Reaktion. Die Kontrollstämmen waren positiv.

13. Verhalten gegenüber Kohlenhydraten.

Es wurde das Verhalten der Vibrionen und vibrionenähnlichen Stämme gegenüber einer Reihe von Kohlenhydraten und dem Glykosid Aeskulin geprüft und die Möglichkeit der Differenzierung untersucht.

Versuchsanordnung.

Nährboden: Peptonsubstrat nach K a u f f m a n n

Diese Bouillon enthält die zu prüfende Zucker in einer Konzentration von 0,5% und als Indikator Bromthymolblau.
pH 7,4 Bebrütung: 7 Tage bei 38° C.

Als Indikator für Aeskulin wurde 1%iges Ferrizitrat verwendet. Vor dem Beimpfen wurde dem Nährboden 400 gamma/ccm Cystein zugefügt.

Die Stämme 1 - 58 wurden mit Inosit, Maltose, Laktose, Saccharose und Aeskulin geprüft.

Die Stämme 42 - 45 und 59, 60 und 72 wurden mit Dulzit, Sorbit, Rhamnose,

Xylose, Mannit, Salizin, Arabinose, Inosit, Maltose, Laktose, Saccharose und Aeskulin geprüft.

Tabelle XI: Verhalten gegenüber Kohlenhydraten

Stamm-Nr.:	42	43	44	45	1-58	59	60	72
Dulzit	-	-	-	-		-	-	-
Sorbit	-	-	-	-		-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-		-	-	-
Xylose	-	-	-	-		+	+	+
Mannit	-	-	-	-		+	+	+
Salizin	-	-	-	-		+	+	+
Arabinose	-	-	-	-		+	+	+
Inosit	-	-	-	-	-	+	+	+
Maltose	-	-	-	-	-	+	+	+
Laktose	-	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	-	-	+	+	+
Aeskulin	-	-	-	-	-	+	+	+

Ergebnis aus Tabelle XI:

Durch ihr Verhalten gegenüber Kohlenhydraten unterscheiden sich die Stämme 59, 60 und 72 von allen übrigen geprüften Vibrionen und vibrionenähnlichen Keimen.

Diese drei Stämme bilden Säure aus Mannit, Xylose, Salizin, Arabinose, Inosit, Maltose, Saccharose und spalten Aeskulin. Dulzit, Sorbit, Rhamnose und Laktose werden nicht angegriffen. Die Säurebildung erfolgt innerhalb von 48 Stunden, dabei tritt der Farbumschlag der Bromthymolblaulösung zu gelb ein.

Aeskulin wird gespalten, dabei bildet sich Aeskuletin, bei Zusatz von Ferrizitrat entsteht ein schwärzlicher Niederschlag durch Reduktion des Eisensalzes.

Alle anderen geprüften Stämme griffen die Kohlenhydrate und Aeskulin nicht an.

II. Untersuchungen über die selektiv-wachstumshemmende Wirkung verschiedener Antibiotika und Hemmstoffe.

Die Tatsache, daß Vibrionen gegenüber bestimmten Antibiotika verhältnismäßig unempfindlich sind, wurde von verschiedenen Autoren zur Hemmung der Begleitkeime bei der Isolierung von Vibrionen ausgenutzt.

In meinen Untersuchungen prüfte ich die für Vibrionen erträglichen Konzentrationen verschiedener Antibiotika und auch einiger in der Literatur angegebener Hemmstoffe. Zum Vergleich wurde auch die Wirkung auf einige besonders häufig als Begleitkeime vorkommenden Bakterien untersucht.

1. A n t i b i o t i k a .

Verwendet wurden die Antibiotika Aquacillin, Streptomycin, Paraxin, Aureomycin, Polimyxin und Bacitracin.

Die Versuche wurden mit einer Auswahl von Stämmen durchgeführt.

a) Bakterizide Wirkung.

Der Versuch wurde angesetzt, um zu ermitteln, ob die in Peptonwasser gewachsenen Vibrionen und vibrionenähnlichen Keime den Zusatz von 500 gamma Streptomycin oder 500 I.E. Aquacillin / ccm Nährboden ertragen und also diese Konzentration zur Isolierung benutzt werden könnte.

Versuchsanordnung.

Nährboden: Peptonwasser mit Cysteinenzusatz

pH 7,1

Bebrütung: 24 Stunden bei 38° C.

Zur dichtbewachsenen Vibrionenkultur erfolgte der Zusatz von 500 gamma Streptomycin / ccm oder 500 I.E. Aquacillin / ccm.

Hierauf 48 Stunden Bebrütung bei 38° C.

Die Wachstumsdichte und Beweglichkeit der Kulturen wurde nach 24 und 48 Stunden mikroskopisch geprüft. Nach 48-stündiger Einwirkung des Antibiotikums wurden diese Kulturen zur Kontrolle der Lebensfähigkeit in Leberbouillon überimpft und 24 Stunden bei 38° C bebrütet.

Tabelle XIII: Bakterizide Wirkung der Antibiotika

Stamm-Nr.	Aquacillin			Streptomyc.		Kontrollüberimpfung nach 48 Std.		
	K.	24 St.	48 St.	24 St.	48 St.	K.	Aquac.	Streptomycin
1	+++	+++	++	+++	++	+++	-	+
9	+++	+++	+	+++	+	+++	-	-
10	+++	+++	+	+++	+	+++	+	-
54	+++	++	-	++	+	+++	-	-
55	+++	+	-	+++	-	+++	-	-
56	+++	+	-	+	-	+++	-	-
58	+++	+	-	+	-	+++	-	-
61	+++	++	+	++	+	+++	+	-
59	+++	+	+	+	+	+++	++++	+++
60	+++	++	+	++	+	+++	+++	+++
72	+++	++	+	++	+	+++	+++	+++
23	+++	+++	-	+++	-	+++	-	-
24	+++	++	+	++	+	+++	+	+
43	+++	++	+	++	+	+++	++	++
41	+++	+	-	+	-	+++	-	-
28	+++	+	-	+	-	+++	-	-
36	+++	+	-	+	+	+++	+	-

Ergebnis aus Tabelle XIII:

In der Wirkung von Streptomycin und Aquacillin ergab sich kein deutlicher Unterschied.

Nach 24-stündiger Einwirkung des Antibiotikums waren noch alle Röhrchen bewachsen, aber weniger dicht als die Kontrollröhrchen ohne Hemmstoffzusatz (K).

Nach 48-stündiger Einwirkung gelang nur noch bei wenigen Stämmen eine Weiterzucht. Einige Stämme, darunter die Gruppe 59, 60 und 72, waren noch vermehrungsfähig.

b) Bakteriostatische Wirkung.

Plattentest.

Um die für Vibrionen erträgliche Konzentration zu ermitteln, wurde zunächst der Plattentest herangezogen.

Der Plattentest kann nur Hinweise auf die Wirkungsintensität geben, genaue Ergebnisse können damit nicht erzielt werden. Als Kontrolle dienten die für die betreffenden Antibiotika üblichen Testkeime: *Bac. cereus* für Aquacillin, Streptomycin. Paraxin, Aureomycin. *Bact. pyocyaneum* für Polimyxin; und der Mikrokokkenstamm SG 511 für Bacitracin.

Versuchsanordnung.

Nährboden: Blutplatten (10% Hammelblut)

Bebrütung: 3 Tage im evakuierten Zeißlertopf unter Zusatz von etwa 10% CO₂ bei 38° C.

Mit einer Kapillare wurde ein Tropfen einer dichtbewachsenen Leberbouillon-Kultur auf die Blutplatte gebracht und mit dem Erigalskyspatel gleichmäßig verteilt.

Auf die beimpfte Platte wurde ein für solche Versuche übliches Papierplättchen gebracht und mit der Antibiotikumlösung getränkt. Die Zahlen in der Tabelle geben den Radius des Hemmhofes in mm an, gemessen vom äußeren Plättchenrand bis zum Beginn der Wachstumszone. Plus (+) bedeutet keine Hemmung der Keime.

Aus diesem Versuch geht hervor, daß Aquacillin, Streptomycin, Paraxin und Aureomycin schon in einer Konzentration von 5 I.E. bzw. 5 gamma wachstums-

Tabelle XIV: Wachstum der Vibrionen bei verschiedenen Antibiotikum-

konzentrationen

[illegible]

hemmend auf Vibrionen und ähnliche Keime wirken. Als Nährbodenzusatz zur Isolierung kämen also nur geringere Konzentrationen für die meisten Keime in Frage.

Bacitracin bewirkte auch in einer Konzentration von 50 gamma/ccm keine Hemmung der Vibrionen, dagegen wurde der Mikrokokkenstamm schon durch 5 gamma/ccm gehemmt.

Die geringe Wirkung von Polimyxin ist bedingt durch die Versuchsanordnung: Es ist nicht imstande, aus den Plättchen in die Umgebung zu diffundieren. Wird die Polimyxinlösung direkt auf die Blutplatte gebracht, so bewirkt eine Konzentration von 1 gamma pro Plattenhälfte eine deutliche, 25 gamma pro Plattenhälfte eine völlige Hemmung des Wachstums der Vibrionenstämme und auch von *Bact. pyocyaneum*. Die Kontrollhälfte ist dicht bewachsen.

Röhrchentest.

Es wurden dieselben Antibiotika wie im Plättchentest in den dort angegebenen Konzentrationen verwendet.

In diesem Versuch wurde nun die Wirkung der für Vibrionen erträglichen Antibiotika-Konzentrationen auf Begleitkeime geprüft.

Versuchsanordnung.

Nährboden: Peptonwasser mit Cysteinzusatz.

pH 7,2 Bebrütung: 24 Std. bei 38° C.

Das gelöste Antibiotikum wurde jedem Röhrchen unmittelbar vor dem Beimpfen zugesetzt. Als Testkeime wurden der Mikrokokkenstamm SG 511, der *E. coli*-Stamm *Mutaflo* und von *P. vulgaris* und *Ps. pyocyanea* Institutsstämme verwendet.

Tabelle XV:

Selektive Wachstumshemmung häufiger Begleitkeime der Vibrionen

Stamm Nr.	Streptomycin (gamma)			Aquacillin (I.E.)		
	1	5	50	1	5	50
1	++	+	-	++	+	-
9	++	+	-	++	+	-
10	++	+	-	++	+	-
54	+++	+	-	+++	++	-
55	++	+	-	++	-	-
56	++	+	-	+	-	-
58	++	+	-	++	-	-
61	++	+	-	++	-	-
59	+++	++	++	+++	+++	++
60	+++	+++	++	+++	+++	++
72	+++	+++	+++	+++	+++	++
23	+++	++	++	+++	+++	++
24	+++	+++	++	+++	+++	++
43	+++	+++	+++	+++	-	-
41	+++	+	-	+++	+	0
28	+++	+++	++	+++	+++	++
36	+++	+++	++	+++	++	++
SG 511	-	-	-	-	-	-
Coli	+++	-	-	+++	-	-
Proteus	+++	+++	-	+++	+++	-
Pyoc.	+++	+++	-	+++	+++	+

Tabelle XV

Selektive Wachstumshemmung häufiger Begleitkeime der Vibrionen durch Antibiotika

	gamma	9	54	55	56	58	59 60.72	23	43	25	41	28	36	SG 511	Koli	Pyoc.	Proteus
Polimyxin	1	+++	+	+	++	+	+++	+	+	+	+	+++	++	+	+++	+++	+++
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Paraxin	1	++	++	+	+++	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	5	-	-	-	-	-	+	++	+++	++	-	++	++	-	-	++	-
	50	-	-	-	-	-	-	+	-	++	-	+	+	-	-	-	-
Aureomycin	1	+	++	+	+	++	++	+	++	+++	+	+++	+++	-	-	+	+++
	5	-	-	-	-	-	+	-	+	++	-	+	+	-	-	-	++
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacitracin	1	+++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++
	5	+++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++
	50	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	+	++	++

Ergebnis aus Tabelle XV:

Durch 1 I.E. Aquacillin/ccm wurde das Wachstum des Stammes SG 511 völlig gehemmt, während die Vibrionen und vibrionenähnlichen Keime kaum beeinflusst wurden.

Durch 5 I.E. Aquacillin/ccm wurde sowohl SG 511 als auch *P. vulgaris* völlig gehemmt, aber bei dieser Konzentration zeigten auch ein Teil der Vibrionenstämme kein Wachstum mehr. *E. coli* und *P. pyocyanea* blieben unbeeinflusst.

Durch 5 gamma Streptomycin/ccm wird *E. coli* und SG 511 völlig gehemmt, während noch alle Vibrionenstämme Wachstum ergeben, obgleich bei einem Teil der Stämme weniger dicht. *P. vulgaris* und *P. pyocyanea* bleiben unbeeinflusst.

Durch 1 gamma Aureomycin/ccm wurden die Stämme Mutaflor und SG 511 völlig gehemmt, das Wachstum der Vibrionen und vibrionenähnlichen Keime wurde teilweise abgeschwächt.

P. pyocyanea wird etwas gehemmt. *P. vulgaris* bleibt unbeeinflusst.

Durch Zusatz von 50 gamma Bacitracin/ccm wird das Wachstum der Mikrokokken völlig gehemmt.

Alle anderen geprüften Keime werden durch diese Konzentration nicht beeinflusst.

Durch Zusatz von Paraxin und Polimyxin konnte eine Hemmung der Teststämme nicht ohne gleichzeitige Hemmung der Vibrionen und vibrionenähnlichen Keime erreicht werden.

2. Hemmstoffe

Es wurde die Wirkung von Brillantgrün, Malachitgrün, Alkylarylsulfonat und Natriumazid geprüft. Die verwendeten Konzentrationen der Hemmstoffe wurden durch Vorversuche ermittelt.

Versuchsordnung.

Nährboden: Peptonwasser mit Cysteinenzusatz

pH 7,2 Bebrütung: 24 Stunden bei 38° C.

Die Hemmstoffe wurden unmittelbar vor dem Beimpfen jedem Röhrchen zugesetzt.

Tabelle XVI

Selektive Wachstumshemmung häufiger Begleitkeime der Vibrionen durch Hemmstoffe

		gamma	9	54	55	56	58	59	23	43	25	41	28	36	SG 511	Koli	Pyoc.	Proteus
Brilliant- grün	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+	+
	5	-	++	++	++	+	+	+++	-	+	+++	+	+++	+++	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Malachit- grün	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++
	5	++	++	++	-	-	-	+++	-	+	+	-	+	+	-	+++	+++	+
	20	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Alkylaryl- sulfonat	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
	5	-	+	+	++	-	-	+++	++	+	+	-	+	+	-	++	+	+
	10	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	-	-	-	-	-	++	+	+
Natriumacid	25	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	-	+++	+++	++	+	+	++
	50	++	++	++	++	++	+	++	+	-	++	-	++	++	++	+	++	++
	75	+	+	+	+	+	+	++	-	-	++	-	++	++	+++	-	-	-
	100	+	+	++	-	+	-	++	-	-	++	-	++	+	+++	-	++	-
	125	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	++	+	+++	-	-	-

Ergebnis aus Tabelle XVI:

Durch 1 gamma Malachitgrün und durch 1 gamma Brillantgrün/ccm Peptonwasser konnten die Mikrokokken völlig gehemmt werden. Das Wachstum von *P. s. pyocyanea* und *P. vulgaris* wurde deutlich vermindert.

Die Vibrionen und vibrionenähnlichen Keime bleiben unbeeinflusst. Durch 1 gamma Alkylarylsulfonat/ccm wurden die Mikrokokken etwas im Wachstum gehemmt, die übrigen Keime blieben unbeeinflusst. Bei 5 gamma/ccm wuchs S6 511 nicht mehr, auch die meisten Vibrionen wurden völlig gehemmt. Der Stamm 59 zeigte auch bei 100 gamma noch dichtes Wachstum.

Durch Natriumazid kann bei 25 gamma/ccm eine deutliche Wachstumshemmung von *E. coli*, *P. s. pyocyanea* und *P. vulgaris* erreicht werden. Durch 50 gamma/ccm wird *E. coli* völlig gehemmt. Von den Vibrionenarten wurden die Kotstämme gehemmt.

Durch 75 gamma Natriumazid/ccm wurde sowohl *E. coli* als auch *P. vulgaris* ausgeschaltet. *P. s. pyocyanea* wurde deutlich gehemmt. Alle Vibrionenarten außer den Kotstämmen wachsen bei dieser Konzentration des Hemmstoffs.

Die Mikrokokken wurden durch die verwendeten Konzentrationen von Natriumazid nicht beeinflusst.

Galle als Hemmstoff.

Versuchsanordnung.

Nährboden: Agarnährboden nach K u z d a s und M o r s e (37).

Zu dem Grundnährboden (Agar Agar 5 g, 1000 ccm Rindfleischbouillon) wurde als Hemmstoff nur 40 ccm frische Ochsgalle zugegeben.

Bebrütung: 10 Tage bei 38° C.

Kontrolle: Agar ohne Gallezusatz.

Wie aus Tabelle XVII ersichtlich ist, bestand zwischen dem Wachstum in Agar ohne und mit Gallezusatz weder bei den Vibrionenarten, noch bei den übrigen geprüften Keimen ein Unterschied.

Tabelle XVII

Stamm	Agar		Agar + Galle		Stamm	Agar		Agar + Galle	
	24 Std.	4 Tg.	24	4 Tg.		24 Std.	4 Tg.	24	4 Tg.
1	+	+	+	+	63	-	-	-	-
2	+	+	+	+	64	-	-	-	-
3	+	+	+	+	65	-	-	-	-
4	+	+	+	+	68	-	-	-	-
5	+	+	+	+	69	-	-	-	-
6	+	+	+	+	70	-	-	-	-
7	+	+	+	+	59	+	+	+	+
8	+	+	+	+	60	+	+	+	+
9	+	+	+	+	72	+	+	+	+
10	+	+	+	+	23	+	+	+	+
11	+	+	+	+	24	+	+	+	+
12	+	+	+	+	42	+	+	+	+
13	+	+	+	+	43	+	+	+	+
14	+	+	+	+	44	+	+	+	+
15	+	+	+	+	45	+	+	+	+
16	+	+	+	+	25	+	+	+	+
17	+	+	+	+	40	+	+	+	+
19	+	+	+	+	41	+	+	+	+
20	+	+	+	+	26	+	+	+	+
21	+	+	+	+	27	+	+	+	+
46	-	+	-	+	28	+	+	+	+
47	-	+	-	+	29	+	+	+	+
48	-	+	-	+	30	+	+	+	+
49	+	+	+	+	31	+	+	+	+
50	-	+	-	+	32	+	+	+	+
51	-	+	-	+	33	+	+	+	+
52	+	+	+	+	34	+	+	+	+
53	-	+	-	+	35	+	+	+	+
54	+	+	+	+	36	+	+	+	+
56	+	+	+	+	38	+	+	+	+
57	+	+	+	+	39	+	+	+	+
58	-	+	-	+	Coli	+	+	+	+
555	+	+	+	+	Proteus	+	+	+	+
61	-	-	-	-	S G 511	+	+	+	+
62	-	-	-	-	P y o c y	+	+	+	+

III. Besprechung der Ergebnisse

Die geprüften Stämme weisen neben einer Reihe gemeinsamer Eigenschaften auch charakteristische Unterschiede auf, auf Grund derer sie in Gruppen zusammengefaßt und voneinander differenziert werden können.

I. Gemeinsame kulturelle und biochemische Eigenschaften (Tabelle XVIII).

In Peptonwasser mit Cysteinzzusatz gelang eine Kultivierung aller Vibrionen und vibrionenähnlichen Keime. Steger (57) züchtete Vibrionen auch in Peptonwasser ohne Zusätze. Nach Alexander (1) können Vibrionen Cystein nicht als Energiequelle verwerten. Unter den angegebenen Versuchsbedingungen bewirkte es aber Wachstum auch der Stämme, die in Peptonwasser allein nicht gedeihen. Obwohl Peptonwasser auch mit Cysteinzzusatz zur Züchtung von Vibrionen nicht besonders geeignet ist, wurde doch für verschiedene Untersuchungen dieser Nährboden bevorzugt, weil auf Grund seiner einfachen Zusammensetzung keine Nebenwirkungen auf verwendete Zusätze auftraten.

In Leberbouillon sind nach 8-stündiger Bebrütung alle Stämme gewachsen. Für die Züchtung aller Vibrionen, mit Ausnahme der Gruppe 2, war Leberbouillon von allen geprüften Nährböden der beste.

In Gelatine mit und ohne Natriumthioglykolatzusatz wachsen ebenfalls alle geprüften Keime. Verflüssigung tritt in keinem Fall auf. Dies stimmt mit den Angaben in der Literatur überein, wonach *Vibrio foetus*, *Vibrio jejuni* und *Spirillum suis* Gelatine nicht verflüssigen. Kutscher (36) und Fretter (16) isolierten aus Jauche und Wasser vibrionenähnliche Keime. Diese verflüssigten jedoch Gelatine verschieden rasch.

Nitrat wird meist zu Nitrit reduziert, was aber unter denselben Bedingungen nicht regelmäßig eintreten muß. Hubrig und Wohanka (26) und auch Kawashimo (34) erhielten bei der Prüfung der Nitratreduktion durch Vibrionen auch keine eindeutigen Ergebnisse.

Indol wird nicht gebildet, auch die VPM-Probe und Nitroso-Indol-Reaktion sind negativ ausgefallen. Einige der von Kutscher und Fretter aus Wasser und Jauche isolierten vibrionenähnlichen Keime ergaben dagegen eine positive VPM- und Nitroso-Indol-Probe (36), (16). Die Vibrionen werden durch eine Temperatur von 47°C innerhalb von 24 Stunden abgetötet. Smith und Taylor (59) stellten fest, daß *V. foetus* eine Temperatur von 55°C 5 Minuten lang erträgt.

II. Differenzierung auf Grund unterschiedlicher kultureller und biochemischer Eigenschaften (Tabelle XVIII).

1. Gruppe: *V i b r i o - f o e t u s* - Stämme

Bei den 44 Stämmen dieser Gruppe war auf Grund der Katalaseprobe und der Prüfung der H_2S -Bildung nach B r y n e r und F r a n k (8) eine Einteilung in

katalasepositive und H_2S -negative (35 Stämme) und
katalasenegative und H_2S -positive (9 Stämme) möglich.

Folgende Eigenschaften waren allen diesen Stämmen gemeinsam:

Die ersten Subkulturen wuchsen nur bei einer Temperatur von $38^{\circ}C$, nicht bei 22° oder $5^{\circ}C$.

K u z d a s und M o r s e (37) züchteten katalasepositive Vibrionen bei $15^{\circ}C$, katalasenegative wuchsen erst bei $20^{\circ}C$.

In saurem oder stark alkalischem Medium, bei pH 5,1, 8,6 und 9,1 wuchsen diese Vibrionen nicht.

In Peptonwasser ohne Cysteinzusatz oder in Peptonwasser mit Cystein und 5% Harnstoff wuchsen sie ebenfalls nicht. Eine Reihe von Kohlenhydraten und Aeskulin werden nicht angegriffen. Dieselben Ergebnisse erhielten auch P r i c e, P o e l m a und F a b e r (45) und S t e g e r (57).

Außer in der Katalase- und H_2S -Bildung unterscheiden sich die Stämme dieser Gruppe auch noch durch weitere Eigenschaften. So reduzierten nur die katalasepositiven und H_2S -negativen Stämme meist Nitrat und zeigten gutes Wachstum in Agar.

Die Alkalibildung in Rindfleischbouillon war bei den katalasepositiven und H_2S -negativen Stämmen stärker als bei den katalasenegativen und H_2S -positiven.

Daß die katalasenegativen und H_2S -positiven Stämme auf Agar nicht gewachsen sind, kann dadurch erklärt werden, daß es sich bei diesen um frisch isolierte Stämme handelte. B e r g e y (4) und K a w a s h i m o (34) geben an, daß frisch isolierte Vibrionenstämme auf Agar nicht angehen.

2. Gruppe: 59, 60, 72.

Diese Gruppe von vibrionenähnlichen Stämmen unterschied sich fast in allen untersuchten Eigenschaften wesentlich von den übrigen Gruppen.

Gemeinsam mit den meisten Vibrionenstämmen war ihnen der positive Ausfall der Katalaseprobe und die fehlende H_2S -Bildung, sowie der im allgemeinen positive Ausfall der Nitratreduktion. Ähnlich den *Vibrio foetus*-Stämmen zeigen sie gutes Wachstum nur bei $38^\circ C$.

Zum Unterschied von diesen lag ihr pH-Optimum im stark alkalischen Bereich.

In Rindfleischbouillon zeigten sie die stärkste Alkalibildung (Verschiebung des pH-Wertes um 2,5) von allen geprüften Stämmen. In Leberbouillon ist optimales Wachstum nach 8 Stunden erreicht, es erfolgt dabei Säuerung der Bouillon bis zu pH 5,4 (Ausgangs-pH-Wert 7,2), wobei die Keime absterben. Nach 24 Stunden sind keine beweglichen Vibrionen mehr im Nährboden. Dieses Verhalten ist charakteristisch für diese Gruppe.

In Peptonsubstrat mit Zuckerzusätzen wurde festgestellt, daß diese Stämme in der Lage sind, auch verschiedene Kohlenhydrate (Mannit, Xylose, Salizin, Arabinose, Inosit, Maltose und Saccharose) zu spalten. Auch Aeskulin wurde abgebaut.

Da diese Stämme gegenüber den geprüften Antibiotika und Hemmstoffen besonders resistent waren, ist es verwunderlich, daß sie in Peptonwasser mit 5% Harnstoffzusatz kein Wachstum zeigten.

Vibrionenähnliche Stämme mit diesen kulturellen und biochemischen Eigenschaften sind in der Literatur nicht beschrieben.

3. Kotstämmе

Die neun Kotstämmе dieser Gruppe stammten von verschiedenen Tierarten. Sie unterscheiden sich von der V.f.-Gruppe durch ihr Wachstum auch bei $22^\circ C$ und $5^\circ C$, dadurch, daß ihr pH-Optimum im stark alkalischen Bereich liegt und durch ihr dichtes Wachstum in Peptonwasser ohne Cysteinzusatz.

Daß diese Stämme im Gegensatz zu den Jauchestämmen auch bei $38^\circ C$ gut gedeihen, läßt ihre Mittelstellung zwischen den *V. foetus*- und Jauchestämmen erkennen. Durch ihre Katalasebildung und den negativen Ausfall der H_2S -Probe stehen sie den *Vibrio-foetus*-Stämmen nahe, durch ihr gu-

tes Wachstum bei niederen Temperaturen und im stark alkalischen Milieu den Jauchestämmen.

4. Jauchestämme

Es wurden 15 Stämme aus Jauche von verschiedenen Tierarten untersucht. Die Jauchestämme sind von den Kotstämmen dadurch zu unterscheiden, daß frisch isolierte Jauchestämme bei 38° C nicht wachsen, sondern in kurzer Zeit absterben.

Wider Erwarten bildeten nun auch diese Stämme Katalase, welche Eigenschaft nach den Angaben in der Literatur vor allem pathogenen Vibrionen zukommen soll. Doch konnten auch K u z d a s und M o r s e (37) katalasepositive Vibrionen aus Erde, Wasser und Käse isolieren.

Die Differenzierung auf Grund des Wachstums bei verschiedenen Temperaturen ist nur bei frisch isolierten Stämmen möglich. Bei längerer Züchtung auf künstlichen Nährböden verlieren sie allmählich diese Unterschiede; so wachsen nach einiger Zeit auch die Jauchestämme bei 38° C und die V i b r i o - f o e t u s - Stämme bei 22° C.

K u t s c h e r (36) konnte aus Schweinekot und Wasser vibrionenähnliche Keime isolieren, von denen einige nur bei 22° C wuchsen. In der 32. Generation hatten sie sich an die veränderten Bedingungen angepaßt und wuchsen auch bei 37° C.

3. Möglichkeit der Isolierung aus verunreinigtem Material (Tabelle XIX).

Aus den Untersuchungen an einer Auswahl von Vibrionen und vibrionenähnlichen Keimen im Vergleich zu einigen häufigen Begleitbakterien ergab sich, daß die Wirkung der verwendeten Antibiotika und Hemmstoffe sich jeweils nur gegen eine bestimmte Keimart richtete und somit durch einen dieser Zusätze keine selektive Wachstumshemmung aller auftretenden Begleitkeime erzielt werden kann. Die beste Wirkung zeigte noch das von R o l l e (50) angegebene Natriumazid, das vor allem P r o t e u s v u l g. hemmt, der ja durch sein Schwärmen besonders stört.

Ein kombinierter Zusatz von Antibiotika und Hemmstoffen zu den zur Isolierung verwendeten Nährböden würde die Laboratoriumsdiagnostik erschweren und zudem unwirtschaftlich machen, zumal auch damit nach verschiedenen Angaben in der Literatur (34, 37) keine befriedigenden Ergebnisse erzielt wurden.

Tabelle XVII:

Zusammenfassung der kulturellen und biochemischen Eigenschaften der Vibrionen
und vibrionenähnlichen Mikroorganismen

	Vibrionen		59,60,72	Ketstämme 9	Jauchest. 15
	a) 35	b) 9			
Katalase	+	-	+	+	+
H ₂ S	-	+	-	-	-
Temperatur					
38 Grad	+	+	+	+	-
22 G(24 St.)	-	-	-	+	+
5 G(24 St.)	-	-	-	+	+(2 -)
pH 5,1	-	-	-	- (1+)	- (2 +)
7,1	+	+	+	+	+
8,6	-	-	+	+	+
9,1	-	-	+	+	+
Alkalibildg. (24-48 St.)	1-1,5	0,1-0,7	2,4	1,5-2	2
Peptonwasser	-	-	+	+	+
o.Cystein	-	-	+	+	+
Leberbouillon	+	+	-(Säuerung)	+	+
Hirn	+	+	+	+	+
Gelatine	+	+	+	+	+
Agar (+Galle)	+	-	+	+	+
Harnstoff 1%	+		+	+	+
5%	-		-	+	+
Nitratreduk.	+	-	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-
VPR	-	-	-	-	-
Nitros-Indol	-		-	-	-
Aeskulin	-		+	-	-
Xylose			+	-	
Mannit			+	-	
Salizin			+	-	
Arabinose			+	-	
Inosit	-		+	-	-
Maltose	-		+	-	-
Saccharose	-		+	-	-
Dulzit			-	-	
Sorbit			-	-	
Rhamnose			-	-	
Laktose	-		-	-	-

Tabelle XIX

Übersicht über die selektiv-wachstumshemmende Wirkung verschiedener Antibio-
tika und Hemmstoffe

	Vibrionen	Mikro- kokken	Coli	Proteus	Pyoc.
Aquacillin					
1 gamma	+	-	+	+	+
5 gamma	+-	-	+	-	+
Streptomycin					
5 gamma	+	-	-	+	+
Aureomycin					
1 gamma	+	-	-	+	+
Bacitracin					
50 gamma	+	-	+	+	+
Paraxin					
5 gamma	+-	-	-	-	+
Brillantgrün					
1 gamma	+	-	+	+	+
5 gamma	+-	-	-	-	-
Malachitgrün					
1 gamma	+	-	+	+	+
Alkylaryl- sulfonat					
5 gamma	+-	-	+	+	+
Natriumazid					
75 gamma	+	+	-	-	+
- Jauche- stämmе					

F. Zusammenfassung

1. Es wurden 72 Stämme von Vibrionen und vibrionenähnlichen Mikroorganismen in ihren kulturellen und biochemischen Eigenschaften untersucht.
2. Zur Differenzierung von Vibrionen eignen sich besonders die Katalaseprobe, die Prüfung der Schwefelwasserstoffbildung, die Feststellung des Temperatur- und pH-Wert Optimums, sowie das Wachstum in Peptonwasser.
3. Mit diesen Methoden konnten die Stämme in verschiedene Gruppen eingeteilt werden, die auch ihrer Herkunft (Genitalien und Foeten, Kot und Jauche etc.) entsprachen.
4. Die *V i b r i o - f o e t u s* - Gruppe umfaßte katalasepositive und H_2S -negative und katalasenegative und H_2S -positive Stämme.
5. Die Gruppe der Stämme 59, 60 und 72 steht nach den oben angegebenen Differenzierungsverfahren zwischen den *V i b r i o - f o e t u s* - Stämmen und den Kot- und Jauchestämmen, unterscheidet sich aber in weiteren kulturellen und biochemischen Eigenschaften wesentlich von allen anderen Stämmen.
6. Im Hinblick auf die Isolierung von Vibrionen aus Untersuchungsmaterial wurde die selektiv wachstumshemmende Wirkung verschiedener Antibiotika und Hemmstoffe auf häufige Begleitbakterien untersucht. Zur Isolierung von *V i b r i o f o e t u s* aus verunreinigtem Material war Natriumacid als Hemmstoff für die Begleitkeime außer für Mikrokokken noch am besten geeignet.

G. Literaturverzeichnis

- 1) A l e x a n d e r, J.K.: Energy sources utilized by *Vibrio fetus*.
Journ.of Bact. 74, 168, 1957.
- 2) v. B a l l m o o s, P.: Über die Vibrionendysenterie des Schweines.
Inaug.-Diss. Bern 1950.
- 3) B e e r, J.: *Vibrio fetus* - Funde in Sachsen-Anhalt.
BMTW 1, 10, 1955.
- 4) B e r g e y : Manual of Determinative Bacteriology by
Breed R.S., Murray E.G.D. Hitchens A.P.
5. Ausgabe 1948, Baltimore.
- 5) B e r t h e l o u, M. et
T o u r n u t, J.: La Vibriosis.
Rec.de Med.vet. 105, 709, 1954.
- 6) B r o d a u f, H.: Beobachtungen zum klinischen Bild der
Vibriosis.
M.Hefte Vet.med. 9/10, 208, 1955.
- 7) B r y n e r, J.H. und
F r a n k, A.H.: A preliminary Report on the Identification of *V.fetus*.
Am.J.Vet.Res. 16, 76, 1955.
- 8) B r y n e r, J.H. und
F r a n k, A.H.: Laboratory Techniques for Isolation and
Propagation of *Vibrio* from Cattle.
Am.J.Vet.Res. 16, 634, 1955.
- 9) D e d i é, K. und
V o i g t, A.: Ein Vorkommen von *Vibrio fetus* beim Bullen
und seine mögliche Bedeutung.
Mh.Vet.Med. 9, 101, 1954.
- 10) D e d i é, K. und
V o i g t, A.: Die Vibriosis genitalis des Rindes in
Mitteldeutschland.
M.H.Vet.Med. 463, 1955.
- 11) D o y l e, L.P.: The Etiology of Swine Dysentery.
Am.Journ.Vet.Res. 9, 50, 1948
9, 314, 1948.

- 12) Mc Fadyean und
Stockman :
Abortion of Cattle and Sheep. Rpt. Departmental Committee Appointed by the Department of Agriculture and Fisheries to Inquire into Epizootic Abortion.
Teil I, S. 15, 1909
Teil II, S. 9, 1913.
- 13) Florent, A.:
Isolement d'un vibrion saprophyte du sperme du taureau et du vagin de la vache.
(Vibrio bubulus).
C.r.Soc.Biol. 147, 2066, 1953.
- 14) Florent, A.:
Méthode d'isolement de Vibrio foetus à partir d'échantillons polymicrobiens, spécialement du liquide préputial. Milieu sélectif: "coer sang gélose au vert brillant" en microaerobiose.
Compt.rend.Soc.Biol. 150, 1059, 1951.
- 15) Florent, A. et
Vandeplasche, M.:
Valeur comparée de la Genisse d'Epreuve et de la culture sur milieu sélectif du liquide préputial, pour la confirmation de l'infection à Vibrio fetus du taureau.
III Intern.Congress on Animal Reproduction Cambridge June 1956, Pathologie 15.
- 16) Frencken, R.:
Serologische Untersuchungen an Vibrionen und ihren Fermenten.
Zbl.Bakt. (I Orig.) 156, 523, 1951.
- 17) Futatabi, H.:
Etiological observation of infectious abortion in cattle in Japan.
J.cent.Vet.Med. 37, 1, 1922.
- 18) Garm, O., Lindquist, K.
Skjerven, O.:
Podmingsforsok pa sau med bevinen Vibrio fetus stamme.
Nordisk Vet.Med. 7, 948, 1955.
- 19) Gauthier, J. et
Cheré, J.:
Etude de l'avortement vibrionien dans l'espèce bovine. Isolement des souches de Vibrio foetus. Rec.Med.Vet.131, 555, 1955.
- 20) Goerttler, V.:
Probleme der Vibriosis Infektion und der Vibriosis Forschung. M.Hefte f.Vet.Med.5, 99, 1956.

- 21) G ö t z e, R.: Paarungs- und Besamungsinfektionen beim Rind. DTW, 57, 377, 1950.
- 22) H a l l m a n n, L.: Bakteriologie und Serologie. 2. Auflage, Stuttgart 1955.
- 23) H a n s e n, P.S., P r i c e, S u i t a b l e t h i o g l y c o l a t e M e d i a f o r t h e K.E. u n d C l e m e n t s, M.F.: C u l t i v a t i o n o f V i b r i o f e t u s . J o u r B a c t . 64, 772, 1952.
- 24) H a r m s, F. Die Züchtung von 'Vibrio fetus und Vibrio Hörter, R.: suis. DTW, 320, 1953. ..
- 25) H u b r i g, Th.: Zur bakteriologischen Diagnostik von Vibrio fetus. M.Hefte f.Vet.Med. 12, 271, 1956.
- 26) H u b r i g, Th. Zur Frage der Erkennung Vibrio fetus infizierter Deck- und Besamungsbullen. W o h a n k a, K. u n d G r ä n z, G.: BMTW, 69, 479, 1956.
- 27) H u b r i g, Th. u n d Serologische und biochemische Untersuchungen an Vibrionen. W o h a n k a, K.: BMTW, 69, 4, 1956.
- 28) H u b r i g, Th. Das charakteristische Wachstum von Vibrio R ö h r, E.: fetus (des Rindes) auf Blutagar. Zbl.Bakt. (I Orig.) 167, 233, 1957.
- 29) H u b r i g, Th. u n d Vibrio fetus. Klinische Schlußfolgerungen W o h a n k a, K.: auf Grund biochemischer und serologischer Untersuchungen. MH. f.Med.Vet. 11, 452, 1956.
- 30) H u d d l e s o n, J. A Satisfactory Medium for the Isolation, F o r r e s t, M.: Cultivation and Maintenance of Viability of Vibrio fetus (Bovine). J.Bakt., 56, 508, 1948.
- 31) J a n s e n, J. u n d Die Züchtung von Vibrio fetus auf bebrütetem Hühnerei. K u n s t, H.: Vet. Bull., 21, 600, 1951.
- 32) J o n e s, F.S. u n d The Etiology of Infectious Diarrhea (Winter L i t t l e, R.B.: Scours) in cattle. J.Exp.Med., 53, 835, 1931.

- 33) Jones, F.S.,
Orcutt, M. und
Little, M.B.: Vibriosis (v.jejuni n.sp.) associated with
intestinal disorders of cows and calves.
J.of Exp.Med., 53, 835, 1931.
- 34) Kawashima, H.
et al. Studies on Vibriosis in Cattle. Offic.
Intern.Epizo.Rapp.22, (361) 1, 1954, Tokyo.
- 35) Kellner, W.: Über ein einfaches Verfahren der Hemmung
des Schwärmens von B.proteus.
Zbl.Bakt. (I Orig.), 161, 150, 1954.
- 36) Kutscher: Die während des Herbstes 1894 in den Ge-
wässern Gießens gefundenen Vibrionen.
Zsch.f.Hygiene, 19, 1895.
- 37) Kuzdas, C.D.,
Morse, E.V.: Physiological characteristics differentia-
ting Vibrio fetus and other Vibrios.
Am.J. of Vet.Res. 17, 331, 1956.
- 38) Leidl, W. und
Mahrle, A.: Das Verhalten von Trichomonas foetus und
Vibrio foetus bei der Tiefkühlung.
DTW, Zuchthyg. etc. 5, 501, 1954.
- 39) Lerche: Spirillen als Ursache des ansteckenden Ver-
kalbens. DTW, 281, 1922.
- 40) Marsh, L.N. und
Firehammer, S.P.: Serological Relationships of 23 Ovine and
3 Bovine Strains of Vibrio fetus.
Am.J.Vet.Res. 19, 396, 1953.
- 41) Messerli, W.: Bakteriologische und serologische Untersu-
chung über den Vibrio coli beim Schwein.
Diss. 1953, Bern.
- 42) Mitscherlich, E. Untersuchung über die Vibrio fetus Infektion
u. Forscher, E.: des Rindes.
M.Heft f.Tierheilkunde, 8, 135, 1956.
- 42a) Mitscherlich, E. Die serologische Differenzierung von Vibrio
und Liess, B.: foetus Stämmen. DTW 65, 2, 1958.
- 43) Osborne, J.C. and al.: The Stimulated Growth of Vibrio fetus by the
Use of Hormones.
J.of Bact. 70, 250, 1955.

- 44) P r i c e, K.E.,
P o e l m a, L.J. und
F a b e r, J.E.: Preliminary Report on Serological Relations-
hips Between Strains of *Vibrio fetus*.
Vet.Med. 48, 355, 1953.
- 45) P r i c e, K.E.,
P o e l m a, L.J. und
F a b e r, J.K.: A Serological and Physiological Relationship
Between Strains of *Vibrio fetus*.
Am.J.Vet.Res. 16, 164, 1955.
- 46) P r i e r, J.E.: *Vibrio abortus*.
Med.Vet., 47, 85, 1952.
- 47) P r ö g e r, K.: Beitrag zur Epidemiologie der Vibriosis in
Thüringen.
M.Hefte f.Med.Vet. 9, 197, 1956.
- 48) R e i c h, C.V.,
M o r s e, E.V. and
W i l s o n, J.B.: Gaseous Requirements for Growth of *Vibrio*
fetus.
Am.J.Vet.Res., 17, 140, 1956.
- 49) R o l l e, M. und
M u n d t, W.: Untersuchungen über *Vibrio foetus* und ähn-
liche Mikroorganismen.
Zbl.f.Vet.Med., 8, 759, 1954.
- 49a) R o l l e, M. und
M u n d t, W.: Die Züchtung von *Vibrio foetus*, *Spirillum*
suis und ähnlichen Mikroorganismen.
Zbl.f.Med.Vet. 5, 451, 1955.
- 50) R o l l e, M.: Mikrobiologie und allgem.Seuchenlehre.
Enke Verlag Stuttgart 1958.
- 51) R o l l e, M.,
M u n d t, W. und
Z i n t z, G.: *Vibrio jejuni* als Enteritiserreger beim Rind.
TU, 11, 381, 1955.
- 52) S c h m i d, G. und
K l i n g l e r, K.: Über die Schweine-Dysenterie
Schweizer Arch.f.Tierheilkunde 91, 1949.
- 53) S c h m i d, G. und
K l i n g l e r, K.: Über einige Schweinekrankheiten, von einem
neuen aetiologischen Faktorenkomplex aus
betrachtet. DTW, 285, 1951.
- 54) S c h m i d, G.: Über die Beziehung zwischen der Ödemkrankheit
und der Dysenterie der Schweine. Schweizer
Arch.f.Tierheilkunde 97, 1, 1955.

- 55) S c h n e i d e r, D.W.
und M o r s e, E.V.:
The growth and viability of *Vibrio fetus*
and related vibrios in media containing ox
bile. Cornell Veterinarian 45, 84, 1955.
- 56) S t e g e n g a, Th.,
T e r p s t r a, J.I.:
Over *Vibrio fetus* - infecties bij het rund
en "Enzoötische steriliteit".
Tijdschr.Diergenesk. 74, 293, 1949.
- 57) S t e g e r, G.:
Beobachtungen zur *Vibriosis genitalis* beim
Rind. DTW, Zuchthyg.etc. 4, 49, 1956.
- 58) S m i t h, T.:
Spirilla Associated with Disease of Fetal
Membranes in Cattle.
J.Exp.Med., 28, 701, 1918.
- 59) S m i t h, T. und
T a y l o r, M.S.:
Some Morphological and Biological Characters
of the *Spirilla* associated with disease of
the fetal membranes of cattle.
J.Exp.Med. 30, 299, 1919.
- 60) T e r p s t r a, J.I.:
A case of "enzootic sterility". (*V.fetus*;
Pleuropneumonia-like organisms.).
XV Int.Vet.Congr. Stockholm 1953
I/2 V 180, 811.
- 61) T e r p s t r a, J.I.:
Vibrio Foetus in Holland.
Vet. Bull. 25, 104, 1955.
- 62) T h o u v e n o t, H. und
F l o r e n t, A.:
Etude d'un Anaerobie du Sperme du Taureau
et du Vagin de la Vache. *Vibrio bubulus*
Florent 1953.
Ann. Inst.Pasteur 86, 237, 1954.
- 63) V a l l é, A.:
A Propos du diagnostic de la vibriose
(*Vibrio foetus*).
Rec. de Med.Vet., 91, 131, 1955.
- 64) V i n c e n t, R.:
L'infection placentaire à *Vibrio foetus*.
La Presse Medicale, 57, 1230, 1949.
- 65) V o i g t, A.:
Über eine kulturelle Methode zur Isolierung
von *Vibrio fetus* aus genitalen Sekreten
männlicher und weiblicher Rinder.
Zbl.Bakt. (I Orig.) 164, 1955.

- 66) W i i d i k, R.W. und
H l i d a r, G.E.: Untersuchungen über die antigene Struktur
von *Vibrio fetus* vom Rind.
Das Kapsel- oder K-Antigen von *V. fetus*.
Zbl. f. Vet.Med. II, 238, 1955.
- 67) W o h a n k a, K.: Kritische Bemerkungen zur Frage der
Vibriosis genitalis in Rinderbesamungs-
ringen Mitteldeutschlands.
M.Hefte f.Med.Vet. 11, 101, 1956.
- 68) W o h a n k a, K. und
H u b r i g, Th.: Enzootische Sterilität und Vibriosis.
BMTW, 6, 105, 1956.

Am Schlusse meiner Arbeit möchte ich
Herrn Professor Dr. M. R o l l e für
die Überlassung des Themas und seine
Unterstützung herzlich danken.

Lebenslauf

Am 9. April 1934 wurde ich, Margot Weiger, als Tochter des Oberförsters Josef Weiger und seiner Ehefrau Justina, geb. Mader, in Winhöring im Landkreis Altötting geboren.

Die Volksschule besuchte ich in Winhöring und anschließend bis zum Abitur im Jahre 1952 die Oberrealschule in Mühldorf am Inn.

Im Winter-Semester 1952 begann ich das Studium an der Universität München und studierte zunächst 2 Semester Naturwissenschaft und dann Tierheilkunde. Im Januar 1958 be-
schloß ich das Studium mit der tierärztlichen Prüfung.

